

**BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AUSGEWÄHLTER METALLOCCENDERIVATE
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
IHRER TUMORAFFINITÄT**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
WOLFRAM KLOSE
aus Wolfsburg

Berlin 1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AUSGEWÄHLTER METALLOCCENDERIVATE
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
IHRER TUMORAFFINITÄT**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

WOLFRAM KLOSE

aus Wolfsburg

Berlin 1976



1. Gutachter: Prof. Dr. M. Wenzel
2. Gutachter: Prof. Dr. H.R. Maurer
3. Gutachter: Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung : 30.11.1976

MEINEN ELTERN

Die vorliegende Arbeit wurde in der Radioisotopen-
abteilung des Instituts für Pharmazie der Freien
Universität Berlin auf Anregung und unter Anleitung
von Herrn Prof. Dr. M. Wenzel durchgeführt.

Für das fördernde Interesse an dieser Arbeit, die
zahlreichen klärenden Diskussionen sowie die stete
Hilfsbereitschaft möchte ich

H e r r n P r o f . D r . M . W e n z e l

herzlich danken.

Mein Dank gilt im weiteren Herrn Dr. R. H e r k e n
vom Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
für die stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung und
Interpretation der Mikroautoradiographien.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Hauptteil und Versuchsergebnisse	
1. Literatur über Radiopharmaka zur Tumordiagnose	3
2. Ausscheidung und Organanreicherung einiger Ruthenocen-Derivate	8
3. Versuche zur Tumoranreicherung bei Ruthenocen-diester und bei Metalloccen-carbonsäuren	
3.1. Ruthenocen-diester	14
3.2. Tumoranreicherung durch pH-Verschiebung bei Metalloccen-carbonsäuren?	17
4. Tumoranreicherung durch Einwandern markierter Leukozyten? Versuche mit Cinnamoyl-Ruthenocen	
4.1. Literaturübersicht zur Anreicherung von Leukozyten in Tumoren	21
4.2. Die Verteilung von Cinnamoyl-Ruthenocen in Mäusen, Ratten und Meerschweinchen	27
4.3. Die Verteilung von Cinnamoyl-Ruthenocen in Mäusen nach i.p., i.v. und i.m. Injektion	30
4.4. Die Anreicherung von Cinnamoyl-Ruthenocen in Lymphozyten	42
4.5. Die Immunantwort der Maus auf die von uns benutzten Tumore	49

4.6. Die Anreicherung von Cinnamoyl- Ruthenocen im Thymus nach Beeinflussung des Organs mit Cortison	51
4.7. Zeitabhängigkeit der Organanreicherung von Cinnamoyl-Ruthenocen	53
4.8. Die Organaffinität von Cinnamoyl- Ruthenocen als Funktion der injizierten Substanzmenge	56
4.9. Anreicherung von Cinnamoyl-Ruthenocen im Tumor?	58

C. Diskussion	61
---------------	----

D. Zusammenfassung	72
--------------------	----

E. Material und Methoden	75
--------------------------	----

F. Literaturverzeichnis	95
-------------------------	----

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In den letzten Jahren hat das Gebiet der Nuklearmedizin eine stürmische Entwicklung erfahren. Auf diesem Sektor der Medizin werden radioaktive Verbindungen zur Diagnose, Therapie und klinischer Forschung eingesetzt.

Diese allgemein als Radiopharmaka bezeichneten Substanzen dienen zur Lokalisation bestimmter Organe oder Strukturen oder zur Funktionsprüfung von physiologischen oder biochemischen Leistungen von Organen, Geweben oder Gewebeteilen.

Nuklearmedizinische Diagnoseverfahren werden heute in großem Umfang angewendet. Erinnerung sei nur an die Lokalisationsdiagnostik z.B. der Schilddrüse, Niere, Leber, Milz oder des Gehirns sowie an Funktionsprüfungen der Schilddrüse, Leber und der Niere.

Therapeutische Einsatzmöglichkeiten von radioaktiv markierten Verbindungen treten gegenüber den diagnostischen zurück.

Im wesentlichen werden drei Forderungen an ein für nuklearmedizinische Untersuchungen geeignetes Präparat gestellt.

1. Optimale diagnostische Aussagen
2. Minimale Strahlenbelastung für den Patienten
3. Unschädlichkeit der Vehikelsubstanz für den Organismus

Da bei diesen Diagnoseverfahren eine hohe Strahlungsenergie des Radiopharmakons erforderlich ist, können als radio-

aktive Isotope nur γ -Strahler verwendet werden. Dieses sind meist Metalle, so daß der chemischen Variation der Verbindungen enge Grenzen gesetzt sind.

Die 1951 (1) entdeckten Metallocene (Dicyclopentadienyl-Metall-Verbindungen) könnten sich möglicherweise in mehrfacher Hinsicht als Radiopharmaka eignen:

1. Obgleich sie in ihrem chemischen Verhalten organischen Charakter besitzen, gestatten sie den Einbau geeigneter γ -Strahler in Form von Metallisotopen.
2. Sie zeigen in der Regel das typische Verhalten von Aromaten und lassen sich dementsprechend vielfältig substituieren.
3. Chemisch sind sie größtenteils sehr stabil.

D. LANGHEIM (2) und E. NIPPER (3) hatten in Mäusen und Ratten bei nur geringer Änderung der Metallocenseitenkette zum Teil erhebliche Unterschiede in den Organverteilungen gefunden.

In Fortführung früherer Arbeiten sollten weitere Metallocen-Derivate auf ihre Organverteilung hin untersucht werden. Dabei war die Tumoraffinität von Metallocen-Derivaten ein wichtiger Aspekt.

B. HAUPTTEIL UND VERSUCHSERGEBNISSE

1. Literatur über Radiopharmaka zur Tumordiagnose

Die Früherkennung von malignen Tumoren ist eines der Hauptziele der Nuklearmedizin. Immer größere Anstrengungen werden heute unternommen, neue und bessere Verbindungen zur Tumordiagnose zu entwickeln.

Dabei werden hauptsächlich zwei Wege eingeschlagen. Zum einen wird eine zellspezifische Funktion des gesunden Gewebes ausgenutzt, die das kranke Gewebe nicht zeigt. Das Radiopharmakon reichert sich im gesunden Gewebe an und läßt den Tumor als Aussparung erkennen (indirekter Nachweis). Dieser Weg ist nicht spezifisch, da auch benigne Prozesse zellspezifische Funktionen örtlich aufheben können (z.B.: Entzündung, Nekrose, Blutung).

Die zweite Möglichkeit ist die Ausnutzung einer zellspezifischen Funktion zur Einschleusung des Radionuklids in den Tumor (direkter Nachweis). In der Hauptsache wertet man folgende Eigenschaften des Tumors im Vergleich zum gesunden Gewebe aus:

1. Ein erhöhter Grundumsatz, wobei das Radiopharmakon ein Substrat für die Tumorzelle darstellt.
2. Eine erhöhte Blutzufuhr in das Tumorgebiet, welche einen vermehrten Transport des Vehikels in das betroffene Gewebe gewährleistet.

3. Das Vorkommen von tumorbegleitenden Antigenen, welche mit Hilfe von Radiopharmaka nachgewiesen werden können.
4. Ein größerer vaskulärer und interstitieller Raum, welcher eine längere Verweildauer des an Protein gebundenen Vehikels im Tumorgebiet erlaubt.

Unter den zahlreichen Radiopharmaka, die zur Entdeckung maligner Tumoren verwendet werden, hat ^{67}Ga -citrat die größte Bedeutung erlangt. Als erste führten EDWARDS und HAYES (58, 59) diese Verbindung zur Tumorszintigraphie von Tieren und Menschen ein.

Andere Autoren (15 - 17) haben von $^{111}\text{InCl}_3$ als tumorsuchende Substanz in Menschen und Tieren berichtet.

HUNTER und DE COCK (15) beschrieben die selektive Aufnahme von Indium-Salzen in implantierte Rattentumore. Die Lokalisierung von bösartigen Geschwülsten bei Menschen mit Hilfe von In-Transferrin wurde später von GOODWIN et al. (16) und FARRER et al. (17) gezeigt.

Auch $^{197}\text{HgCl}_2$ wird heute in der Klinik als Radiopharmakon häufig gebraucht. RAYNAUD und Mitarbeiter (71) beschrieben ihre Erfahrungen bei der Entdeckung von Tumoren im Thorax-Bereich. Sie zeigten, daß dieses Radionuklid in der Lage ist, bösartige von gutartigen Geschwülsten mit einiger Sicherheit zu unterscheiden. Andere Autoren (18, 72) konnten diesen Befund sichern.

SAHA et al. (73) verglichen Ga-Citrat, InCl_3 und HgCl_2 miteinander. Sie fanden nur 1 bis 3% der injizierten Dosis pro Gramm Tumor nach verschiedenen Zeiten (siehe auch Tab. 15). Diese Werte lagen meist unter denen, die die Autoren für die Leber, Milz, Niere, Lunge, das Herz und den Gastrointestinaltrakt gefunden hatten.

EDWARDS et al. (66) und GOODWIN et al. (64) konnten die mit In und Ga erhaltenen Werte bestätigen.

SERAFINI et al. (75) fanden im Gegensatz zu den drei letztgenannten Autoren für das InCl_3 eine größere Tumoraффinität als für Ga-citrat.

Die von SAHA et al. mit Ga-citrat erzielten Ergebnisse lassen sich auch mit denen von HIGASHI et al. (74) vergleichen. Sie fanden im allgemeinen eine etwas höhere Organanreicherung (z.B.: Tumor 3,31%/g statt 2,50 %/g), was sich möglicherweise durch die unterschiedliche Darreichungsform erklären läßt (SAHA: i.v., HIGASHI: i.p.).

Eine gewisse Bedeutung für die Tumorsuche mit radioaktiven Stoffen haben auch das Fibrinogen und die Fibrinogen-Antikörper erhalten. Doch obwohl sich in Mäusetumoren erheblich (Faktor 70) mehr Substanz anreicherte als in derselben Menge Muskel, konnte TAYLOR (76) ähnliche Ergebnisse mit menschlichen Tumoren nicht reproduzieren.

Eine notwendige Verbesserung der nuklearmedizinischen Tumordiagnostik kann in erster Linie von der Entwicklung neuer Radiopharmaka erwartet werden, die sich sowohl in größerem

Maße als auch für einzelne Tumoren selektiver im malignen Gewebe anreichern.

Bei der Entwicklung neuer Radiopharmaka ist es wünschenswert, die physikalischen Eigenschaften des Radionuklids (z.B.: Strahlungsenergie und Halbwertszeit) auf der einen und die chemische Struktur der Verbindung auf der anderen Seite unabhängig voneinander festzusetzen.

Da verwendbare γ -Strahler meistens Metalle sind, ist es schwierig, Radiopharmaka mit den unterschiedlichsten Strukturen zu synthetisieren. Dieser Nachteil kann zu einem geringen Teil durch Komplexbildner ausgeglichen werden.

Eine besonders günstige Variationsbreite sowohl der physikalischen als auch der chemischen Eigenschaften läßt sich mit radioaktiven Metallocenen erreichen. Metallocene führen einerseits zu einem breiten Spektrum an organischen Derivaten, während andererseits verschiedene zur Metallocen-Bildung geeignete Metall-Ionen als radioaktive Zentralatome eingesetzt werden können. Besonders vorteilhaft haben sich bisher radioaktive Nuklide des Eisens und des Rutheniums erwiesen. Mit diesen beiden Metallen gelingt die radioaktive Markierung des Zentralatoms in einer Ein-Schritt-Reaktion mit zum Teil hohen Ausbeuten (10-70%) (77).



Fe



Ferrocen



Ru



Ruthenocen

Tab. 1: Übersicht der nuklearmedizinischen Tumordiagnostik

Wenn lediglich das Nuklid angegeben ist, wird das Radiopharmakon in einer wasserlöslichen Salzform appliziert.

Mechanismus der Anreicherung	Radiopharmakon	vorwiegend verwandt für	Literatur
<u>Indirekter Nachweis</u>			
(zellspezifische Funktionen)	75-Selenmethionin	Pankreastumor	4 - 7
	197-Hg-Cl-merodrin		
	131-J-Hippursäure	Nierentumor	8 - 10
	131-J	Schilddrüsenmetastasen	11 - 14
	99-Tc, 113m-In	Leber, Milz, Knochenmark	15 - 23
<u>Direkter Nachweis</u>			
1. gesteigerte Zellfunktionen	32-P, 75-Se	Augen-, Haut-Mammatumore	24 - 30
2. erhöhte Blutzufuhr	87-Sr	Knochentumore	31 - 33
3. gerinnungsphysiolog. Prozeß	131-J-Fibrinogen 131-J-Fibrinogen-Antikörper	verschiedene Tumore	34 - 37
4. Verteilung im intravasalen u. interstitiellen Raum	74-As, 131-J-Albumin 99-Tc, 111-In, 64-Cu 202-Bi, 197-Hg 67-Ga	Hirntumore auch für Tumore im Bereich des Abdomens u. der Extremitäten Tumore des RES und andere	38 - 43,13 15 - 23,9 44 - 50 51 - 70

2. Ausscheidung und Organanreicherung einiger Ruthenocen-Derivate

Ausscheidung

Ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung eines Radiopharmakons ist seine Verweildauer im Körper. Je schneller eine Verbindung eliminiert wird, desto geringer ist die Strahlenbelastung, der ein Patient ausgesetzt wird.

Die Radioaktivität in Form von $^{103}\text{RuCl}_3$ wurde innerhalb der ersten 24 Stunden p. inj. deutlich langsamer ausgeschieden als in Form der meisten ^{103}Ru -Ruthenocen-Derivate (Tab. 2, Abb. 1 u. 2). Die Ausnahme bildete das Cinnamoyl-Rc. Diese Verbindung hat eine lipophile Seitenkette. Rc-carbonsäure, als hydrophilste unter den getesteten organischen Substanzen, wurde am schnellsten ausgeschieden. Daraus glaubten wir ableiten zu können, daß die Ausscheidungsgeschwindigkeit proportional mit der Wasserlöslichkeit der Ruthenocen-Derivate ansteigt. Um diese Vermutung zu prüfen, stellten wir den lipophilen/hydrophilen Verteilungskoeffizienten der Verbindung fest (E. 4.6.) und setzten ihn in Relation zur Ausscheidung.

Der Vergleich der Gesamtausscheidung mit den Verteilungskoeffizienten konnte unsere Vermutung nur in etwa stützen.

Ein besseres Bild ergab der Vergleich der Urinausscheidung mit den Verteilungskoeffizienten. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß das sehr lipophile Cinnamoyl-Rc im Gegensatz zu den anderen Metallocenen nur wenig über den Harn, dagegen aber fast vollständig durch die Faeces

Tab. 2: Ausscheidung einiger Ruthenocen-Derivate bei Mäusen

Eingesetzte Dosis (i.p.): a) Metallocene 0,4-24 μ Mol/kg= 2,9-96 μ Ci/kg
 b) RuCl₃ 47,8 μ Mol/kg=20 μ Ci/kg
 c) Ga-citrat 1,3 μ Ci trägerfrei
 spez. Aktivität 1mCi/ml in 0,9 %-iger NaCl

$$Q = \frac{\text{Ipm/ml n-Octanol}}{\text{Ipm/ml PO}_4\text{-Puffer}} \text{ (siehe E. 4.6)}$$

Werte für die Harnausscheidung wurden von Ratten erhalten
 genaue Bezeichnung der Derivate nach IUPAC und von uns
 benutzte Abkürzungen siehe E. 4.1.

Verbindung	n	% der injiz.Dosis in 24 Std. ausgeschieden		Tip./hydr. Verteilungs-koeffizient (Q)	H • Q
		Kot + Harn	Harn (H)		
Rc-COOH	5	93,4 + 1,3	83,6 *	0,34 +	28,4
				17,4 ++	1455
Rc-CONH ₂	4	82,6 +25,0	52,0 •	21,8	1133
Rc-COCH ₃	4	54,1 + 5,5	27	23,7	640
Rc-(COCH ₃) ₂	4	69,2 +20,5	65,7 •	21,8	1432
Rc-COCHCHC ₆ H ₅	35	37,3 + 2,4	3,25 *	318,4	1035
Rc-CHCHCOC ₆ H ₅	7	59,6 +12,8	--	--	--
Rc-COOCH ₃	4	58,1 +15,0	45,5 *	85,9	3908
Rc-(COOCH ₃) ₂	4	90,1 + 7,7	60,5 *	134,0	8107
RuCl ₃	4	35,1 + 1,6	--	--	--
Ga-citrat	7	27,6 + 3,6	--	5,8 • 10 ⁻⁵	--

*) Werte nach Nipper (3); •) Werte nach D. Langheim (2)

+) pH 7,4 (Verbindung dissoziiert); ++) pH 3,0 (Verbindung undissoziiert)

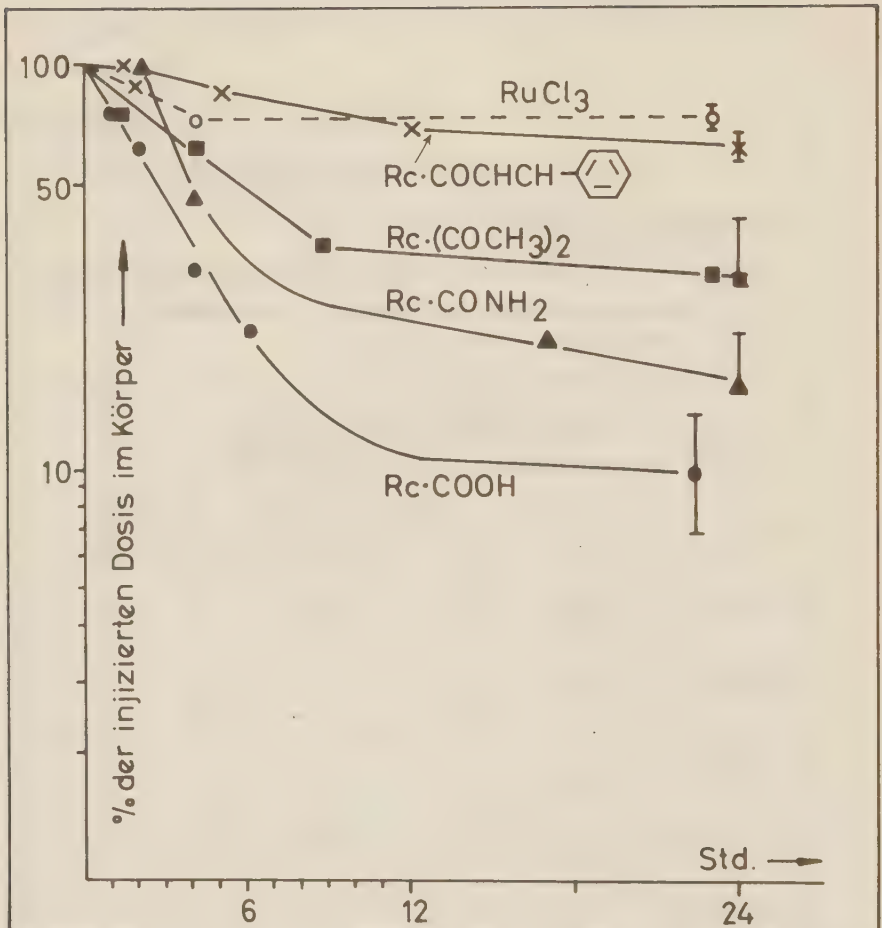


Abb. 1: Ausscheidung einiger Ruthenocene f(t)

Legende siehe Tabelle 2

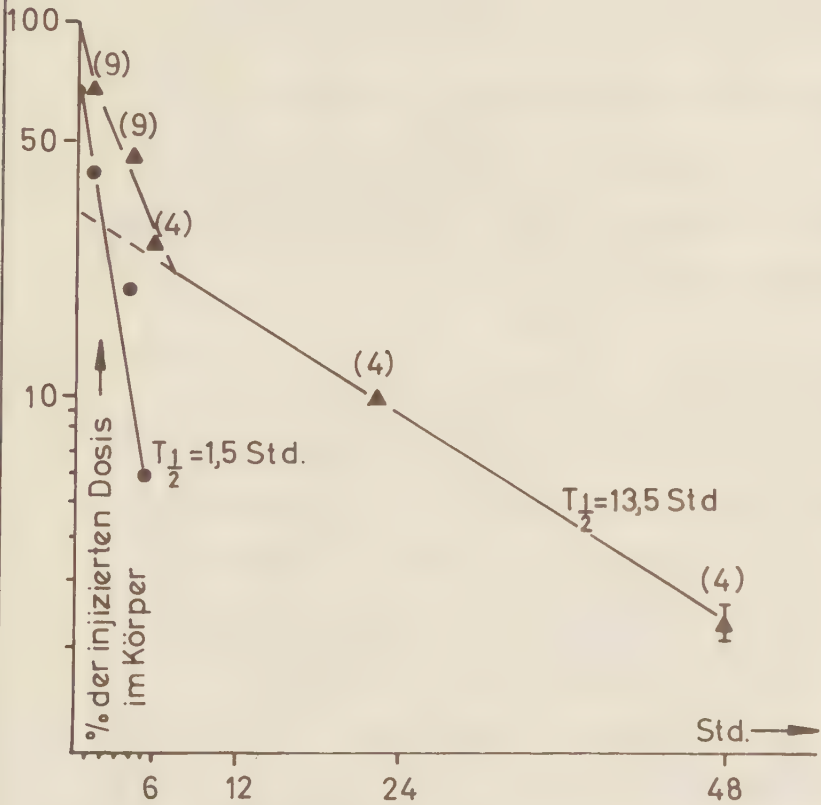


Abb. 2: Biologische Halbwertszeiten von Rc-Diester
in Mäusen

inj. Dosis: 100 $\mu\text{Ci/kg}$; 11 $\mu\text{Mol/kg}$.

Zu den biologischen Halbwertszeiten ($T_{1/2}$) gelangt man, indem die Verlängerung der Asymptote (Kurvenauslauf) der Ermittlung der langsamen HWZ dient.

Die schnelle HWZ läßt sich durch Subtrahieren der Werte der langsamen HWZ von den Meßwerten im steilen Kurvenbereich ableiten.

eliminiert wird. Das arithmetische Produkt aus Urinausscheidung und Verteilungskoeffizienten entsprach jetzt dem der übrigen Ruthenocen-Derivate (Tab. 2).

Rc-ester und Rc-diester wurden im Organismus zur Carbonsäure hydrolysiert (3) und diese wurde rasch ausgeschieden. Der Faktor aus dem Verteilungskoeffizienten und der Harnausscheidung war so insgesamt höher als bei den anderen Ruthenocen-Derivaten.

Organverteilung

Die deutlichen Unterschiede im Retentionsverhalten der verschiedenen Metalloccen-Derivate ließen den Schluß zu, daß die Substanzen im Organismus unterschiedliche Organaffinitäten aufweisen. Zur Ermittlung der Verteilung töteten wir die behandelten Mäuse nach 24 Stunden und entnahmen in der Regel Proben folgender Gewebe:

Muskel (vom Oberschenkel), Tumor, Leber,

Niere, Nebenniere, Milz und Lunge

Die injizierten Verbindungen reicherten sich im allgemeinen in der Leber am stärksten an (Tab. 3). Hervorzuheben ist ferner die hohe Konzentration von Rc-carbonsäure in der Niere, über die schon gesondert berichtet wurde (89).

Die Nebenniere zeigt für Rc-carbonsäure und insbesondere für Acetyl-Rc eine große Affinität (Faktor 50 gegenüber dem Muskel) (siehe auch 156).

Tab. 3: Organaffinität einiger Ruthenocen-Derivate

Eingesetzte Dosis a) Metallocene 0,4-24 μ Mol/kg=2,9-96 μ Ci/kg
 pro Maus: b) RuCl₃ 47,8 μ Mol/kg=20 μ Ci/kg
 c) Ga-citrat 1,3 μ Ci trägerfrei; spez.
 Aktivität
 1 mCi/ml in 0,9 %iger NaCl

n > 4; relativer Fehler: im Durchschnitt 30 %

Tumor: Ehrlich Karzinom solid, 7 - 8 Tage nach Inoc., Ø 15 mm

getötet: 23 - 27 Stunden nach i.p. Injektion

Substanz	% der inj.Dosis		*relat.Organaffinität, Muskel = 1					
	pro g Muskel	pro g Tumor (A)	Tumor (B)	Leber	Niere	Neb. Niere	Lunge	Tumor- index (A•B)
Rc-COOH	0,010 +0,002	0,020 +0,009	2,2 +0,6	173	524	53,4	3,4	0,044
Rc-CONH ₂	0,011 +0,003	0,021 +0,010	1,9 +0,9	237	56,1	29,2	21,9	0,038
Rc-COCH ₃	0,15 +0,07	0,13 +0,04	0,8 +0,2	26,8	6,2	53,2	6,3	0,10
Rc-(COCH ₃) ₂	0,027 +0,005	0,053 +0,011	2,0 +0,5	73,6	11,5	17,0	4,5	0,11
Rc-COCHCHC ₆ H ₅	0,28 +0,20	0,25 +0,11	0,9 +0,7	76,1	3,5	13,1	10,2	0,23
Rc-CHCHCOC ₆ H ₅	0,080 +0,024	0,15 +0,06	1,9 +0,7	68,7	5,2	22,8	13,5	0,29
Rc-COOCH ₃	0,034 +0,011	0,065 +0,009	1,9 +0,4	95,4	23,6	31,2	17,1	0,11
Rc-(COOCH ₃) ₂	0,004 +0,003	0,023 +0,020	5,6 +4,3	267	24,4	20,5	9,0	0,13
RuCl ₃	0,58 +0,20	1,04 +0,13	1,8 +0,2	6,9	8,1	5,9	3,0	1,9
Ga-citrat	0,55 +0,12	3,47 +0,43	6,3 +0,6	9,8	11,2	5,1	4,4	2,2
Fc-COOH	0,069 +0,017	0,26 +0,09	3,8 +1,2	159	117	9,7	6,9	1,0

*) bedeutet: $\frac{\text{Ipm/mg Organ}}{\text{Ipm/mg Muskel}}$

Wie erwartet reichert sich Ga-citrat von den untersuchten Verbindungen im Tumor am stärksten an. Es wurde bereits auf die große klinische Bedeutung des Ga-citrat für die Tumordiagnose hingewiesen. In Übereinstimmung mit SAHA et al. (73) und HIGASHI et al. (74) fanden wir eine fast gleichmäßige Verteilung dieser Substanz über den Körper, welches die szintigraphische Darstellung des von uns und auch von anderen Autoren (73, 74) verwendeten Tumortyps erschwert.

Die Anreicherung der Ruthenocene in den Organen tumortragender Mäuse unterscheidet sich kaum von den Ergebnissen, die bei gesunden Tieren erhalten wurden (3). Wahrscheinlich waren die Organe des Wirtsorganismus durch den Tumor noch nicht entscheidend geschädigt.

Die bisherigen Versuche zeigten, daß die untersuchten Ruthenocene - eventuell mit Ausnahme des Rc-diester - für die Szintigraphie des von uns verwendeten Tumortyps wenig geeignet sind.

3. Versuche zur Tumoranreicherung bei Ruthenocen-Diester und bei Metallocen-carbonsäuren

3.1. Ruthenocen-Diester

Rc-diester besaß eine signifikant höhere Anreicherung im Tumor als die anderen getesteten Derivate (t - Test $p = 0,05$; verglichen wurden die Werte der relat. Organaffinität des Rc-diester mit denen der Rc-carbonsäure als Beispiel für die übrigen Ruthenocene, Tab. 3)

Sie erreicht etwa den Wert des Ga-citrats.

Aus den genannten Gründen schien es sinnvoll, zunächst weitere Versuche mit dieser Verbindung durchzuführen.

Dieses sollte folgende Fragen klären:

1. Zu welcher Zeit ergibt sich die größte Substanzkonzentration im Tumor?
2. Wann ist der Radioaktivitäts-Quotient Tumor/Muskel am größten?
3. Wie groß ist die Verweildauer der Verbindung in den übrigen Organen?

Uns war bekannt, daß bereits nach 3 Stunden 30 % der Verbindung den Körper wieder verlassen hatten (Abb. 2).

Das setzte eine rasche Resorption vom Injektionsort in die Blutbahn voraus. Tatsächlich zeigte der erste Meßpunkt (3 Std.) die größte Substanzkonzentration in allen Organen (Abb. 3).

Obwohl höhere Werte vor dem ersten Meßpunkt natürlich möglich waren, führten wir keine weiteren Versuche durch. Der Versuch ergab auch so ein klares Bild. Aussagen über Werte zwischen 0 und 3 Stunden ließen keine neuen Gesichtspunkte erwarten.

Zusammenfassend sind folgende Aspekte gegen eine Verwendung des Rc-diester in der Tumorszintigraphie zu nennen:

1. Der Tumor/Muskel Quotient war zu niedrig (zwischen 2.0 und 5.8)
2. Da der Rc-diester aus dem Tumor genauso schnell wie aus den meisten übrigen Organen eliminiert wurde, bot sich zu keinem Zeit-

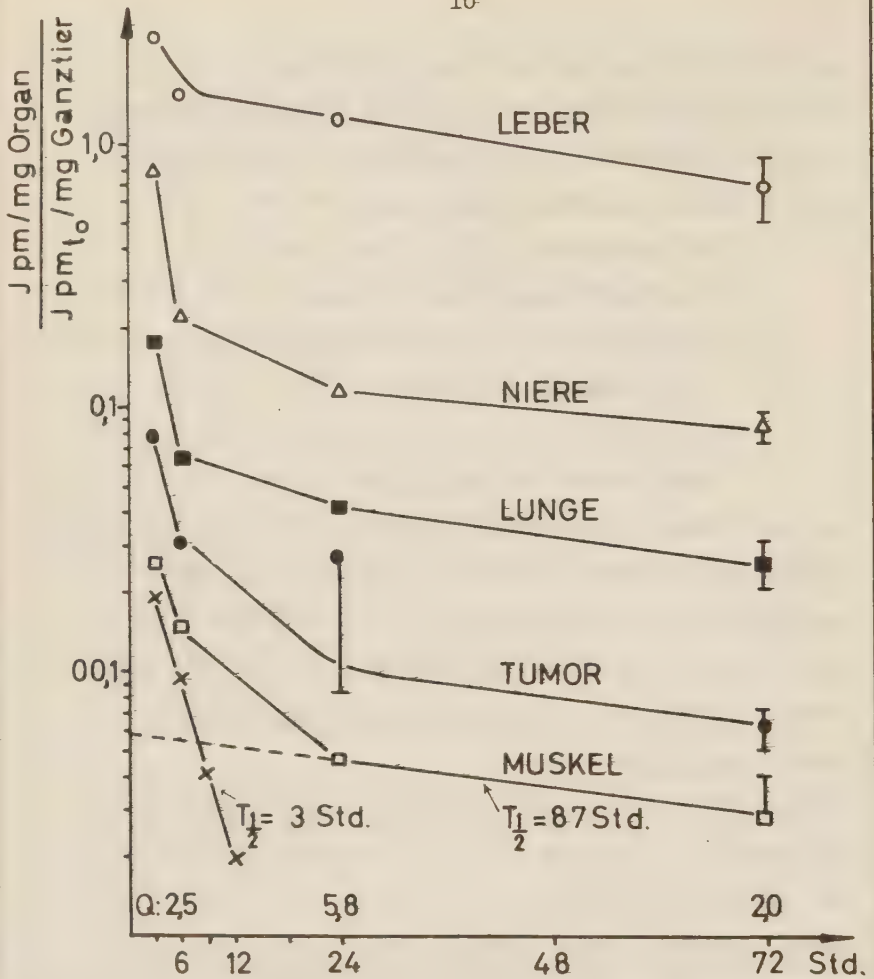


Abb. 3: Zeitabhängigkeit der ¹⁰³Ru-Organverteilung
nach Gabe von Rc-Diester in Mäusen

eingesetzte Dosis: 11,5 $\mu\text{mol/kg}$, 96 $\mu\text{Ci/kg}$ (i.p.)

n: 4; Q: Tumor/Muskel

Tumor: Ehrlich Karzinom solid, 7-9 Tage alt, ϕ 15 mm

Zur Konstruktion der biologischen HWZ siehe Abb. 2

punkt das maligne Gewebe zur Szintigraphie an (Tab. 4).

Tab. 4: Biol. HWZ in verschiedenen Organen nach Ruthenocendiester Injektion (i.p.) bei tumortragenden Mäusen

Organ	Biol. Halbwertszeiten	
	0 - 10 h	10 - 72 h
Leber	1,5	57
Niere	1,5	108
Lunge	2	75
Tumor	3	51
Muskel	3	87

Die biologischen Halbwertszeiten (HWZ) lassen sich aus Abb. 3 ableiten.

3.2. Tumoranreicherung durch pH-Verschiebung bei Metallo- locen-Carbonsäuren

Hier interessierten zwei Metalloccarbonsäuren, da diese dissoziablen Substanzen theoretisch die Möglichkeit boten, sie selektiv in Tumoren anzureichern.

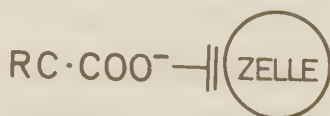
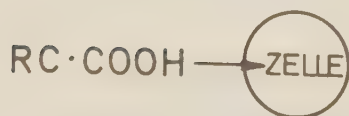
Grundlage unserer Versuche waren Befunde von O. WARBURG (90), daß die Tumorzelle im Gegensatz zur gesunden Zelle Glukose auch bei Sauerstoffangebot verstärkt zu Lactat und wenig zum eigentlichen Endprodukt Kohlendioxid abbaut (aerobe Glykolyse). Durch die entstehende Milchsäure wird der Tumor angesäuert.

M.v. ARDENNE et al. (91, 92) gelang es, in vivo den pH-Wert im Tumorgebiet bis auf 5,8 zu senken. Die übrigen Zellen bauen die angebotene Glukose weiterhin zu CO_2 ab, so daß der pH-Wert im gesunden Gewebe konstant auf 7,4 bleibt. Deshalb ist die Ansäuerung selektiv nur auf den Tumor beschränkt.

Da meist nur undissoziierte Verbindungen die Zellmembran passieren können (93), mußten wir in ein angesäuertes Tumorgewebe Verbindungen bringen, die bei pH 6 undissoziiert und beim physiologischen pH von 7,4 dissoziiert vorliegen. Nach der Henderson-Hasselbalch'schen Gleichung ist das für schwache Säuren mit einem pK_s -Wert um 7,0 der Fall.

pH 6,0

pH 7,4



Fc-carbonsäure (94) (und damit Rc-carbonsäure) schien mit einem pKs-Wert um 6,8 gut geeignet für unsere Untersuchungen.

Da die in vivo-Ansäuerung methodisch relativ schwierig ist (91), führten wir zunächst in vitro Versuche durch.

Erwartungsgemäß war die Resorption der Metalloccen-carbonsäuren abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums (Tab. 5). Das stimmte mit analogen Befunden von DIETRICH et al. (95) überein, die bei Erniedrigung des pH-Wertes eine um den Faktor 3 erhöhte Penetration der untersuchten Nicotinsäure in die Tumorzelle gefunden hatten.

Um die Theorie zu stützen, daß nur dissoziierbare Verbindungen bei pH-Verschiebung mehr oder weniger stark in die Zelle penetrieren, testeten wir auch einige undissoziierbare Ruthenocen-Verbindungen als Vergleichssubstanzen (Tab. 5). Tatsächlich reicherten sie sich im Sauren nicht stärker in den Zellen an als im physiologischen pH-Bereich.

Die hohen Werte für das Cinnamoyl-Rc waren auf die geringe Löslichkeit der Substanz zurückzuführen (Tab. 20). Die Verbindung war in der zugesetzten Konzentration nicht in Wasser löslich. Sie wurde zusammen mit den Zellen abzentrifugiert und täuschte so eine hohe Resorption vor.

Obwohl der Unterschied in der Anreicherung der Metalloccen-carbonsäuren im Tumor statistisch signifikant war

Tab. 5: Bestimmung der in vitro Resorption von Metallo-
enen in Ehrlich Ascites Tumorzellen

Methodik siehe E.4.14 , n: 6

	mMol/l	<u>Ipm/mg Zellen</u> <u>Ipm/mg Überstand</u>		
		pH: 6,3-6,4	7,0-7,3	7,5-7,7
Fc-carbonsäure	2,4	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2
Rc-carbonsäure	0,5	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,05
Rc-carboxamid	0,03	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,9 ± 0,05
Acetyl-Rc	0,06	3,5 ± 0,3	4,4 ± 0,8	3,7 ± 0,3
Rc-diestер	1,2	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,0 ± 0,2
Cinnamoyl-Rc	0,2	90,0 ± 12,7	100,0 ± 8,4	87,7 ± 8,7
Ga-citrat	-	2,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2

p: 0,01 (student-t-Test)

(Student-t-Test $p = 0,01$), war er zu gering, um eine praktische Bedeutung zu erhalten.

4. Tumoranreicherung durch Einwandern markierter Leukozyten? Versuche mit Cinnamoyl-Ruthenocen

Im Laufe unserer Untersuchungen über die Organanreicherung der Metalloccen-Derivate entnahmen wir der Maus außer den üblichen Organen auch verschiedene andere Proben (Blut, Herz, Knochen, Thymus). Auffällig war die hohe ^{103}Ru -Anreicherung nach Gabe von ^{103}Ru -Cinnamoyl-Rc im Thymus (Tab. 6). Dies schien uns aus zweierlei Gründen beachtenswert:

1. Uns war keine radioaktiv markierte Substanz bekannt, die sich stark im Thymus anreichert und demzufolge auch kein Radiopharmakon.
2. Der Thymus besitzt eine große Bedeutung bei der immunologischen Abwehr auch von Tumoren (114 - 116).

Wir entschlossen uns daher, diese Befunde weiter zu verfolgen.

4.1. Literaturübersicht zur Anreicherung von Leukozyten in Tumoren

Der Thymus ist in den letzten Jahren, dank seiner Bedeutung bei immunologischen Vorgängen, mehr in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses gerückt (96, 97). Er ist ein Organ im Brustkorb unmittelbar hinter dem Brustbein. Der Thymus gliedert sich in

Tabelle 6 : Thymusaffinität einiger Ruthenocen-Derivate

getötet : 24 Stunden nach i.p. Injektion der Substanzen

Thymus : Ipm/ mg Thymus
Muskel : Ipm/ mg Muskel

	n	Dosis		% der inj. Dosis/g Thymus	<u>Thymus</u> <u>Muskel</u>
		μ Ci/kg	μ Mol/kg		
Cinnamoyl-Rc	6	1,5	1,5	10,5 $\pm$ 5,0	44,4 $\pm$ 21,5
Rc-phenyl- propenon	7	3,4	1,1	1,2 $\pm$ 0,3	18,2 $\pm$ 5,1
Acetyl-Rc	7	3,2	1,0	1,4 $\pm$ 0,9	7,3 $\pm$ 5,0
Rc-sulfon- amid ^x	7	8,2	14,3	0,21 $\pm$ 0,16	4,0 $\pm$ 3,1

^xmündl. Mitteilung von Dr. E. Stadlbauer

Rinde (Cortex) und inneres Mark (Medulla). Tatsächlich besteht die Rinde zu mehr als 98% aus Lymphozyten.

MILLER und Mitarbeiter (98 - 100) bewiesen 1961, daß neugeborene Mäuse nach operativer Entfernung des Thymus keine Immunität entwickeln können.

Unsere heutigen Vorstellungen lassen einen humoralen und einen zellulären Thymusfaktor vermuten, die die Reifung der immunologisch potenten in die immunologisch kompetenten Immunzellen bewirken. Der humorale Thymusfaktor wird im Thymus produziert, dann in die Blutbahn abgegeben, um die immunologischen Stammzellen in die funktionstüchtigen Immunzellen umzuwandeln.

Der zelluläre Thymusfaktor bewirkt im Thymus die Reifung der lymphoretikulären Stammzellen, die sich nach abgeschlossenem Reifungsprozeß in den lymphatischen Organen (Knochenmark, Milz, Lymphknoten) als Immunzellen ansiedeln (101).

Seit geraumer Zeit vermutet man einen Einfluß von Immunmechanismen auf Geschwulstentstehung und Geschwulstwachstum (101 - 112). Man weiß inzwischen, daß die meisten experimentell erzeugten Tiertumore tumorspezifische Gewebsantigene besitzen (113).

SINKOVICS et al. (114, 115) konnten dies bestätigen. Sie fanden Lymphozyten in gerade entstandenen Tumorgewebekulturen.

BERCZI et al. (116) festigten diese Befunde mit einem durch Methylcholanthren induzierten Tumor in Meerschweinchen. Sie schränkten jedoch die Fähigkeit der Lymphozyten, das Wachstum der Tumorzellen zu verhindern, auf in vitro Versuche ein.

Im lebenden Organismus soll der Tumor Antikörper bilden, die die Körperabwehr durch Lymphozyten schwächen. Diese These wird von zahlreichen Autoren vertreten (117 - 121).

Die Immunantwort des Körpers wird trotzdem auch für die Therapie von Tumoren ausgenutzt. Man stützt sich dabei im wesentlichen auf die Applikation immunkompetenter Zellen, d.h. Lymphozyten (adoptive Immuntherapie) (122 - 131). Insgesamt muß dieser Therapieversuch jedoch als erfolglos angesehen werden (132, 133).

Die Ansiedelung der Lymphozyten im Tumorgebiet kann man jedoch zur Erkennung von Tumoren ausnutzen. Voraussetzung dazu ist die radioaktive Markierung von Zellen.

In diesem Zusammenhang ist die Arbeit von D. ENGLISH (148) zu erwähnen. Er markierte gereinigte Leukozyten in vitro mit einem ^{99}Tc -Schwefel-Komplex, der von den Zellen phagozytiert wurde. Mehr als 99 % der markierten Leukozyten behielten ihre Lebensfähigkeit und Beweglichkeit. Das ist eine Grundvoraussetzung für eine spätere Verwendung als Tumorsucher.

Auch in vivo gelingt die Markierung von Zellen.

K. HOFER et al. (149 - 151) beschreiben eine Methode, L 1210 Leukämie-Zellen mit ^{125}J -Desoxyuridin zu markieren.

Gegenüber den bisherigen Versuchen einer radiaktiven Tumordiagnose glaubten wir, einen großen Vorteil zu besitzen. Die hohe Anreicherung des Cinnamoyl-Rc im Thymus sprach dafür, daß die dort befindlichen Lymphozyten (= Thymozyten) bereits markiert worden waren, so daß wir keine zuvor markierten injizieren mußten.

Obwohl die Einwanderung von Leukozyten in Tumoren nachgewiesen worden war, fehlten noch quantitative Angaben. Deshalb war es wichtig zu wissen, daß sich im Thymus immerhin 11 % der gesamten Lymphozyten befinden (Tab. 7), so daß diesen Zellen auch quantitativ eine Rolle bei der Immunabwehr zukommt.

Das zirkulierende Blut enthält nur 2 % der Lymphozyten. Es transportiert jedoch täglich ein Vielfaches seines Lymphozytengehaltes (134 - 140).

Dies bedeutet, daß beim Menschen täglich mehr als 10 Milliarden Lymphozyten ins Blut eintreten und es wieder verlassen müssen. Sie stammen aus dem Knochenmark und aus allen lymphatischen Organen.

D. METCALF (96) zeigte, daß die im Thymus produzierten Lymphozyten an Ort und Stelle wieder zugrunde gehen.

Demgegenüber wiesen D.D. JOEL et al. (142) und A.D. CHANANA et al. (143) später eine massive Auswanderung der Lymphozyten aus dem Thymus in das Blut autoradiographisch nach. Falls nun Thymocyten durch Cinnamoyl-Rc markiert worden waren, konnten diese aus dem Thymus über die Blutbahn in das Tumorgebiet gelangen. Auf diese Weise würde sich eventuell die Möglichkeit bieten, das maligne Gewebe szintigraphisch nachzuweisen.

Einschränkend muß man aber feststellen, daß der Immunapparat über mehrere Effektoren verfügt, die in der Auseinandersetzung zwischen Wirt und Tumor eine Rolle spielen. Als zellige Elemente sind neben den Lymphozyten auch die Plasmazellen und die Makrophagen zu nennen.

Tabelle 7: Zahl und Verteilung der Lymphozyten bei jungen
erwachsenen Menschen mit 70 kg.

Organ	Zell-Gesamt Zahl	%-Anteil
Blut	10 • 10 ⁹	2,2
Lymphknoten	190 • 10 ⁹	41,3
Milz	70 • 10 ⁹	15,2
lymphat. Gewebe des Darmtraktes	20 • 10 ⁹	4,3
Knochenmark	50 • 10 ⁹	10,9
andere Gewebe	70 • 10 ⁹	15,2
T H Y M U S	50 • 10 ⁹	10,9
Gesamt-Lymphozyten Zahl	460 • 10 ⁹	100,0

aus: F. Trepel in "Lymphozyt und Klinische Immunologie"
H.Themle, H.Begemann, Springer Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York 1975

4.2. Die Verteilung von Cinnamoyl-Ruthenocen in Mäusen, Ratten und Meerschweinchen

Versuche mit Ratten und Meerschweinchen sollten klären, ob sich der Befund der hohen Aktivitäts-Anreicherung im Thymus von Mäusen verallgemeinern läßt.

Die Ausscheidung und Organaffinität von Cinnamoyl-Rc war bei den beiden Tierarten ähnlich wie bei den Mäusen (Abb. 4 und Tab. 8). Meerschweinchen schieden allerdings mehr Substanz über den Harn aus als Mäuse und Ratten. Auch die Gesamtausscheidung war gegenüber den beiden anderen Spezies erhöht. Eventuell läßt sich dieser Unterschied mit einem anderen Metabolismus der Verbindung erklären.

Die Auswertung der Versuche über die Organaffinität von Cinnamoyl-Rc ergab den von uns erhofften Befund:

Auch bei Ratten und Meerschweinchen war der Thymus das Organ mit der höchsten Affinität zu der Substanz.

Wir konnten jedoch nur bei zwei von sechs untersuchten Meerschweinchen einen Thymus finden.

Dabei hatten wir berücksichtigt, daß bei dieser Tierart nach H. TESSERAUX (159) das Organ cervical sitzt. Bei Ratten und Mäusen liegt er im Thoraxbereich. Unsere Tiere waren maximal 6 Wochen alt, weil der Thymus nur bis zur 10. Woche p. nat. relativ groß ist. Er bildet sich danach zurück (153). Möglicherweise beeinflusste die ungewohnte Umgebung die Tiere so stark, daß durch den Streß sich der Thymus - bedingt durch einen hohen Corticoid-Spiegel - zurückgebildet hat.

Tab. 8: Verteilung von Cinnamoyl-Ruthenocen in Mäusen, Ratten und Meerschweinchen

getötet: 24 Stunden nach i. p. Injektion												
$\frac{\text{Organ}}{\text{Muskel}} = \frac{\text{Ipm/mg Organ}}{\text{Ipm/mg Muskel}}$												
$\frac{\%}{\%} \text{ Gew.} = \frac{\% \text{ der injizierten Dosis}}{\% \text{ Anteil des gewogenen Organs am Körpergewicht}}$												
n	Muskel		Thymus		Lunge		Leber		Milz		Dosis	
	%/ % Gew	$\frac{\text{Organ}}{\text{Muskel}}$	%/ % Gew	$\frac{\text{Organ}}{\text{Muskel}}$	%/ % Gew	$\frac{\text{Organ}}{\text{Muskel}}$	%/ % Gew	$\frac{\text{Organ}}{\text{Muskel}}$	%/ % Gew	$\frac{\text{Organ}}{\text{Muskel}}$	$\mu\text{Ci/kg}$	$\mu\text{Mol/kg}$
Maus	35	0,072 +0,050	1	11,5 +4,1	217	0,61 +0,18	10,2	4,2 +1,0	76	3,0 +1,9	15	22
Ratte *)	2	0,062 0,043	1	7,3 20	304	0,61 0,82	15,1	0,65 1,9	28	1,0 1,2	5	3,2
ger- schwein- chen	6	0,041 +0,019	1	1,2*) 6,9	99	0,29 +0,24	6,5	2,6 +1,9	67	0,39 +0,27	1	1,4

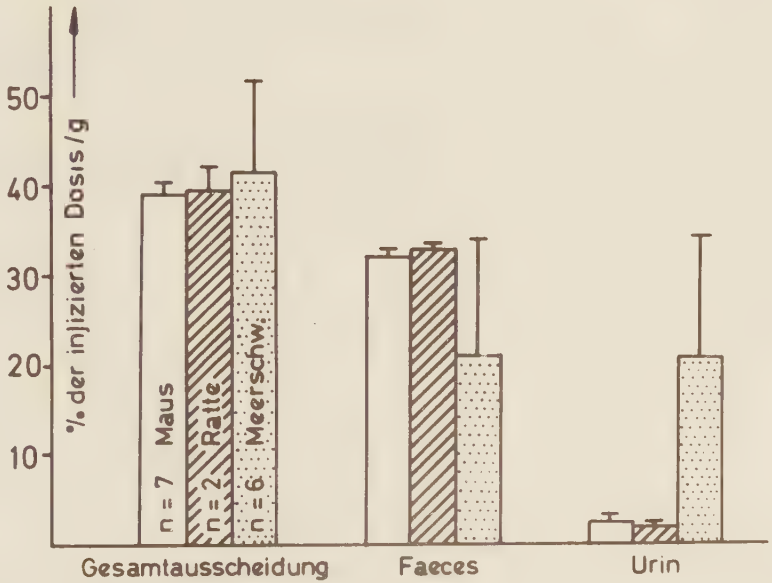


Abb. 4: Ausscheidung von Cinnamoyl-Rc durch Mäuse, Ratten und Meerschweinchen (0-24 Std.)

Legende siehe Tabelle 8, aber Mäuse n: 7, inj. Dosis
 $2 \mu\text{Ci/kg}$, $2,8 \mu\text{Mol/kg}$

4.3. Die Verteilung von Cinnamoyl-Rc in Mäusen nach i.p., i.v. und i.m. Injektion

Als nächstes sollte mit Hilfe der Ganzkörperautoradiographie die hohe Thymusanreicherung des Cinnamoyl-Rc untersucht werden.

Die Abbildungen **5b** + **5c** zeigen die Autoradiographie einer Maus, die i.p. mit Cinnamoyl-Rc behandelt worden ist. Im wesentlichen wurden die unter 2. und 4.2. aufgeführten Ergebnisse bestätigt:

Leber, Milz und Thymus waren deutlich zu sehen. Diese Organe besaßen also die höchste Substanzkonzentration im Tier. Der Thymus war allerdings nicht gleichmäßig markiert. Die Ausschnittsvergrößerung (Abb. **6**) soll zeigen, wie die Markierung am Rande des Organs in unmittelbarer Nähe eines großen Gefäßes liegt.

Bei der Maus war außer dem Thymus noch anderes lymphatisches Gewebe und zwar innerhalb des gastrointestinalen Traktes angeschnitten. Dieses war aber nur teilweise markiert. Lediglich am unteren Ende des Magens (Abb. **5b** und **c**) und scheinbar innerhalb der Leber in dem Bereich, in dem sich die tiefe Schwärzung befindet, konnte diesem Gewebe eine Markierung zugesprochen werden. Auch die beiden Punkte in der Bildmitte (Abb. **5b**) links oberhalb des runden Dünndarmes könnten durch lymphatisches Gewebe hervorgerufen sein. Wie beim Thymus waren in all diesen markierten Bereichen immer Gefäße zu erkennen.

Wir versuchten, die autoradiographischen Befunde über die nur teilweise Markierung von lymphatischem Gewebe zu festigen. In den axillaren Lymphknoten von behandelten Mäusen ließ sich allerdings in keinem Fall Aktivität nachweisen (Lymphknoten: 1,1 %/g; Muskel: 0,5 %/g; n=14).

Auf der nach i.v. Injektion entstandenen Autoradiographie (Abb. 7) war die Leber zu erkennen. Im Gegensatz zur i.p. Injektion ließ sich der Thymus nicht ausmachen, obwohl das Organ angeschnitten war. Auch anderes lymphatisches Gewebe im Bereich des Magen-Darm-Traktes war nicht markiert. Im Brustraum war nur die Herzwand zu sehen. Dieser Unterschied zur i.p. Injektion wurde durch Radioaktivitäts-Messungen der Einzelorgane bestätigt (Tab. 9). Bei fast gleicher Aktivität im Blut war die Substanzkonzentration im Herzen nach i.v. Injektion knapp sieben Mal höher, wogegen sich im Thymus nur etwa 1 % der Aktivität befand, die wir nach i.p. Injektion gefunden hatten.

Offensichtlich ist nur nach der intraperitonealen Gabe Cinnamoyl-Rc in hohem Maße im Thymus nachweisbar.

Wie läßt sich das erklären?

Wir untersuchten folgende Möglichkeiten: In den Bauchraum gebracht spricht die Verbindung des Immunsystems der Tiere an, wird durch Granulozyten phagozytiert und kommt mit diesen Zellen über die Blutbahn zum Thymus, der als immunkompetentes Organ so eine Information über das eingedrungene Antigen erhält (96). Nach i.v. und

Abb. 5a: Schnitt durch eine Maus

Vergrößerung: 1,8 x (Abb. 5a - 5c)

Färbung: Hämalaun (n. Meyer), Eosin

Schnitttdicke: 20 μ m

M: Milz

L: Leber []: siehe Abb. 6

H: Herz

Der Thymus ist das längliche schwarze Organ rechts vom Herzen. Auf der linken Bildhälfte ist der Darm, der teils längs teils quer angeschnitten ist, zu erkennen.

Abb. 5b: Autoradiographie einer Maus

injiz. Dosis Cinnamoyl-Rc (i.p.): 19 μ Mol/kg, 31 μ Ci/kg

getötet: 24 Std. p. inj., Expositionszeit: 21 Tage

L: die Markierung kann lymphatischen Gewebe zugesprochen werden

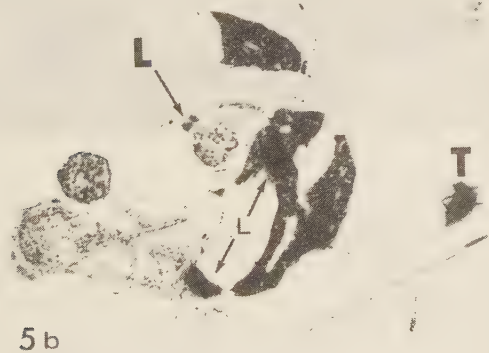
T: Thymus

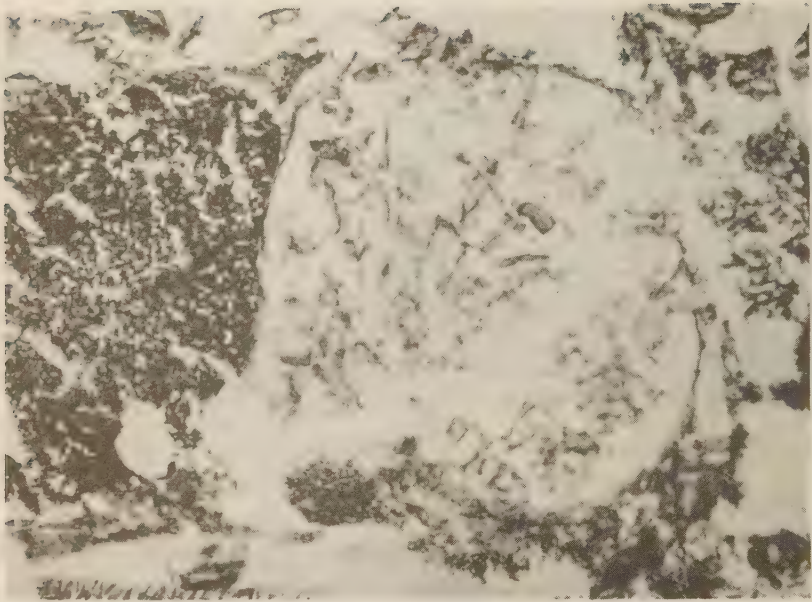
Außerdem sind Leber und Milz markiert. Auch im Darm läßt sich Aktivität ausmachen.

Abb. 5c: Auf den Schnitt (5a) wurde der entwickelte Röntgenfilm gelegt.

Die Markierung des Thymus liegt am Rande des Organs.

1 cm





1 mm

Abb. 6: Ausschnittsvergrößerung des Thymus (siehe Abb.5a)

Vergrößerung: 43,8 x

In der Bildmitte erkennt man ein großes Gefäß.

An der linken Seite schließt sich der Thymus an.

Ebenfalls zum Thymus gehört der sichelförmige Abschnitt auf der rechten unteren Bildseite. Nur dieser Teil ist stark markiert. In Abb. 5c erscheint - bedingt durch das geringe Auflösungsvermögen der Autoradiographie - auch das Gefäß markiert.

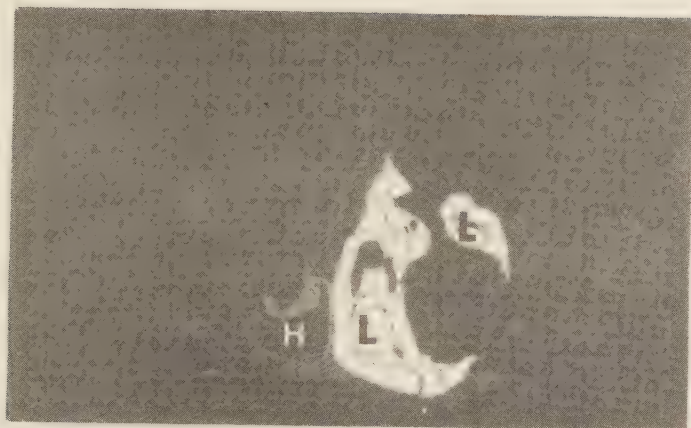


Abb. 7: Autoradiographie einer Maus

Vergrößerung: 1,7 x

Injiz. Dosis Cinnamoyl-Rc (i.v.) : 23 $\mu\text{Mol/kg}$, 28 $\mu\text{Ci/kg}$

getötet: 24 Std. p. inj., Expositionszeit: 21 Tage

Das Bild wurde direkt vom Röntgenfilm erstellt, so daß
alle markierten Stellen weiß erscheinen (negativ).

H: Herz

L: Leber

Schwach markiert sind ebenfalls: Darm, Wirbelsäule,
und Brustbein

i.m. Injektion bleibt die Immunreaktion aus. Die Verbindung reichert sich nicht im Thymus an.

Cinnamoyl-Rc wurde 5 Tage alten Ratten gespritzt, bei denen das Immunsystem noch nicht ausgeprägt ist (154 + 155). Diese Tiere reicherten die Verbindung weitaus weniger im Thymus an als Ratten mit ausgeprägtem Immunsystem (Tab. 10).

Zur weiteren Absicherung wurden Autoradiographien von Blutaussstrichen i.v. und i.p. mit Cinnamoyl-Rc behandelte Mäuse angefertigt. (10 Min. p. inj., denn zu diesem Zeitpunkt hatten wir bereits Aktivität im Thymus gefunden. Dieser Versuch ist nicht aufgeführt)

Falls unsere Vermutung zutreffen sollte, hätte man in den Ausstrichen i.p. behandelter Mäuse die Substanz in den Granulozyten erwartet. Nach i.v. Injektion sollte die Immunreaktion ausbleiben. Die Verbindung hätte sich ausschließlich im Plasma befinden müssen. Bei beiden Ausstrichen aber war weder in Leukozyten noch in Erythrozyten Aktivität auszumachen.

Eine Phagozytose von Cinnamoyl-Rc war also mit unseren Methoden nicht nachweisbar. Aufgrund dieser Befunde ließen sich die Vermutung über den Mechanismus der Anreicherung sowie die Erklärung über den Unterschied in der Thymusanreicherung nach i.v. und i.m. im Gegensatz zur i.p. Injektion nicht aufrecht erhalten.

Tab. 10: Thymusaffinität von Cinnamoyl-Ruthenocen
 =====
 bei neugeborenen Ratten
 =====

getötet: 24 Std. nach i.p. Injektion

Organ/Muskel: (Ipm/mg Organ) : (Ipm/mg Muskel)

%/% Gewicht: % der injizierten Dosis
 % Anteil des gewogenen Organs
 am Körpergewicht

		6 Tage alte Ratten		erwachsene Ratten	
		%/% Gew.	<u>Organ</u> Muskel	%/% Gew. *)	<u>Organ</u> Muskel
Muskel		0,062 + 0,008	1	0,062; 0,043	1
Thymus		0,38 + 0,06	6,2	7,3 ; 20	304
Lunge		0,23 + 0,036	3,7	0,61 ; 0,82	15
Leber		2,2 + 0,35	35	0,65 ; 0,90	28
Milz		0,21 + 0,045	3,4	1,0 ; 1,3	24
injiz.	µCi/kg	17,2		5	
Dosis	µMol/kg	7,8		3,2	
Gewicht (g)		9,1		194	
n		7		2	

*) n = 2, daher beide Einzelwerte aufgeführt

Wir wandten uns nun der Frage zu, ob Cinnamoyl-Rc, ähnlich wie z.B. Steroide, im Plasma an Eiweiß gebunden wird, welches wegen der geringen Löslichkeit der Verbindung im wäßrigen Milieu (E.4.12) vermutet werden konnte. Mit Hilfe der Elektrophorese war keine Bindung an Eiweiß nachzuweisen (Abb.8).

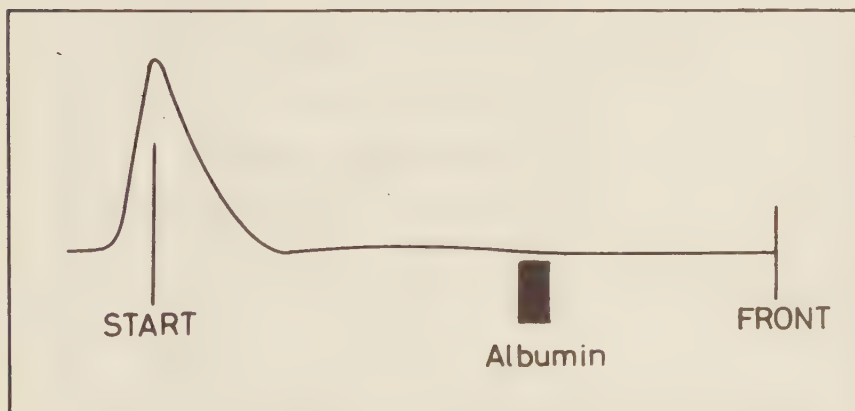


Abb. 8: Scannerbild eines Elektropherogramms von Blut-Serum

Maximum: 100 Ips; Dämpfung: 30; Vorschub 300 mm/Std
 μg Cinnamoyl-Rc/ml Serum: 120; μl /Elektropherogramm: 5
 Elektropherogramm auf Zelluloseacetatpapier; 90 min.;
 140 V; in Barbitalpuffer (pH: 8,6); Barbitalpuffer: 4,405 g
 Veronal, 24,605 g Na-Veronal, ad 4,0 l Wasser

Blut wurde durch Herzpunktion einer Maus gewonnen. Nach Abzentrifugieren der Formbestandteile wurde zu 1 ml Serum die Aktivität in 20 μl Propylenglykol gegeben und 15 min bei 37° inkubiert. Der Übersicht halber wurde nur die Albuminbande eingezeichnet.

Auch die Gelfiltration gab uns keinen Hinweis auf eine Bindung von Cinnamoyl-Rc an Albumin, welches ein unspezifisches Transporteiweiß ist (Tab.11). Das wesentlich hydrophilere Rc-Phenylpropenon wurde als Vergleich

Tab. 11: Eiweißbindung zweier Ruthenocene
=====

Auf eine 25 cm Glassäule, $\varnothing$ 1,5 cm, wurden 20 ml einer 15 %igen Sephadex (G-25, Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) gegeben. Nach dem Absetzen des Sephadex (120 Min.) wurde die Aktivität in 1 ml einer 6 %igen Albumin-Lösung dazugegeben. Als Eluationsmittel diente PO_4 -Puffer. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 15 Tropfen/Min. Das Eluat wurde in Reagenzgläsern gesammelt. Pro Glas wurden jeweils 20 Tropfen aufgefangen. Jedes Reagenzglas enthielt 0,5 ml einer 3%igen Sulfosalicylsäurelösung mit der die Eiweißfraktion nachgewiesen wurde.

Die Eiweißfraktion und die restliche Aktivität (incl. Sephadex der Säule) wurden im Bohrloch-Kristall gemessen.

	Cinnamoyl-Rc	Rc-phenylpropenon
% der einges. Aktivität in der Albuminfraktion	11,9 $\pm$ 5,1	35,0 $\pm$ 17,0
% der einges. Akt. nicht an Albumin gebunden	69,0 $\pm$ 14,1	53,8 $\pm$ 18,7
% der einges. Akt. wiedergefunden	80,9	88,8
eingesetzte Dosis pro l	4,2 μCi 0,19 μMol	5 μCi 1,7 μMol
n	3	2

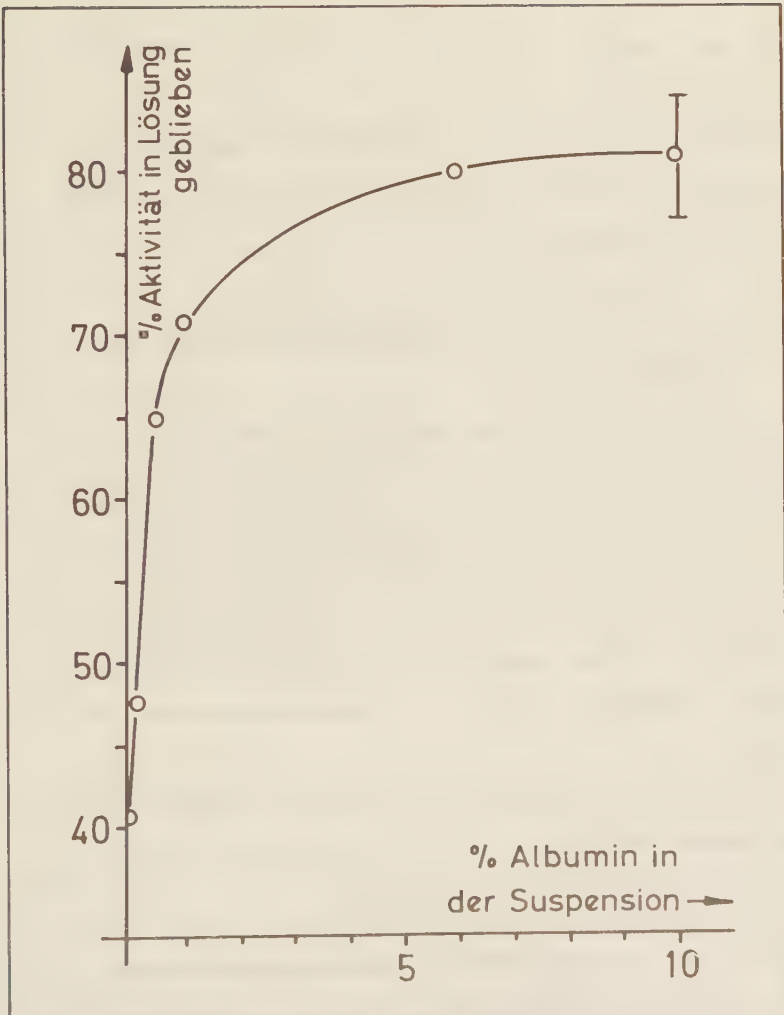


Abb. 9: Löslichkeit von Cinnamoyl-Rc in Abhängig-
keit vom Albuminzusatz

eingesetzte Dosis: 2,8 $\mu\text{Mol/L}$, 3,6 $\mu\text{Ci/L}$

Zellsuspension: 2,3 - 4,0 % in PO_4 -Puffer, t: 20 min.

T: 37°, n: 3. Zu einer Zellsuspension wurde die Aktivität gegeben. Der Teil, der sich nicht löste, fiel aus und wurde mit den Zellen abzentrifugiert.

mit untersucht (E. 4.6.) und zeigte ebenfalls keine Eiweißbindung.

Dem Albumin kann allerdings für das Cinnamoyl-Rc eine Rolle als Lösungsvermittler in einem PO_4 -Puffer zugesprochen werden (Abb. 9).

4.4. Die Anreicherung von Cinnamoyl-Ruthenocen in Lymphozyten

Aus Tab. 9 ist eine hohe Anreicherung von Cinnamoyl-Rc nach i.p. Injektion im Fettgewebe ersichtlich, das aus dem intraperitonealen Raum entnommen wurde. Dieses hätte man zwar einfach erklären können, denn Cinnamoyl-Rc ist eine lipophile Substanz; doch legte dieser Befund den Schluß nahe, daß auch im Thymus die Verbindung im Fett und nicht in den Lymphozyten angereichert wurde.

Im Fettgewebe des Organs ließ sich mit Hilfe der Mikroradiographie keine Substanz ausmachen. Auf eine Abbildung wurde deshalb verzichtet.

Ebenso wie bei der Ganztierautoradiographie zeigte Cinnamoyl-Rc auch mit dieser Methode innerhalb des Thymus bevorzugte Areale der Anreicherung. Abb. 10 gibt einen typischen Ausschnitt aus einem gut markierten Gebiet wieder. Auch hier ist eine Gefäßbeziehung der Markierung zu erkennen (Vergleiche Abb. 6). Lymphozyten waren immer gleichmäßig um Gefäße bzw. Bindegewebssepten herum markiert, welches vermuten läßt, daß die Substanz von

dort in das Organ eingewandert ist. Die Markierung befand sich vornehmlich in der Thymusrinde. Im Mark war viel weniger Aktivität nachzuweisen.

Cinnamoyl-Rc wurde nicht im Zellkern abgelagert (Abb. 11). Es lag vielmehr in den peripheren Bereichen des Zytoplasma, also in Stoffwechsel-aktiven Zentren. Eine genauere Aussage ließ das Auflösungsvermögen der Autoradiographie nicht zu.

Ergänzend dazu wollten wir klären, in welchen Zellorganellen des Thymus Cinnamoyl-Rc gebunden wurde. Dabei bestimmten wir gleichzeitig die subzelluläre Bindung der Substanz in der Leber. Wir erhofften einen ersten Hinweis hinsichtlich des Metabolismus der Verbindung.

Die Substanz wurde in den Lebermitochondrien gebunden (Tab. 12). Dieses ließ den Schluß zu, daß der Organismus versucht, Cinnamoyl-Rc zu verstoffwechseln.

Im Thymus wurde die Anreicherung der Verbindung in stoffwechselaktiven Zentren anhand der hohen Aktivität in den Mikrosomen (Tab. 12) noch einmal verdeutlicht.

Eine mögliche Beziehung zwischen dem Eiweißgehalt der Zellorganellen und der dort gefundenen Aktivität konnte nicht bestätigt werden.

Mit den markierten Thymozyten war eine Grundvoraussetzung für eine eventuelle radioaktive Tumordiagnose erfüllt. Da Lymphozyten aber nur in malignes Gewebe wandern, wenn das Immunsystem des Organismus angesprochen worden ist, galt es nun zu klären, ob der von uns be-

Abb. 10: Mikroautoradiographie eines Mäusethymus

Vergrößerung: 175 x

Injiz. Dosis Cinnamoyl-Rc (i.p.): 9,0 $\mu\text{Mol/kg}$, 20 $\mu\text{Ci/kg}$

getötet: 24 Std. p. inj., Expositionszeit: 10 Tage

M: Mark

🏠: Grenze zwischen Mark und Rinde. In der Rinde erkennt man wesentlich mehr Lymphozyten.

Eine Septe durchläuft das Bild vom rechten unteren Rand kommend bis zur oberen Bildmitte. Die Markierung liegt gleichmäßig um die Septe herum.

Abb. 10a: siehe oben

Vergrößerung: 700 x

★: Markierung innerhalb eines Gefäßes.

Die Aufnahme soll die Gefäßbeziehung der Markierung zeigen.

0,1 mm



30

Abb. 11a + 11b: Einzelne markierte Thymozyten im Mark

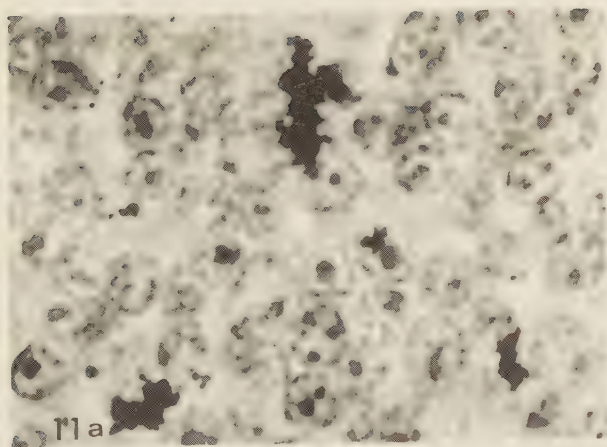
Vergrößerung: 2100 x

Legende siehe Abb. 10

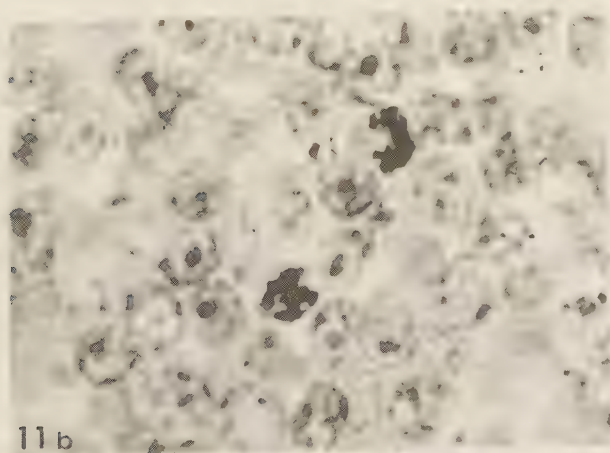
In der rechten Bildmitte (11a) erkennt man eine beginnende Markierung eines Thymozyten. Sie geht vom Zytoplasma der Zelle aus.

Weitere Bildserien zeigten den Verlauf der Markierung.

Nach einer zunächst schwachen Markierung des Zytoplasma nahm sie an Größe zu. Sie schien sich im weiteren Verlauf über die gesamte Zelle zu erstrecken (11b). In der oberen Bildmitte der Abbildung 11a ist eine Endstufe der Markierung zu sehen.



10 μm



Tab. 12: Aktivitätsverteilung in Zellorganellen des Thymus und der Leber

von Mäusen

eingesetzte Dosis: $3\mu\text{Mol/kg}$, $10\text{ }\mu\text{Ci/kg}$

Thymusgewicht: 650 mg , Lebergewicht: 2800 mg , jeweils n: 9

erötet: 24 Std nach i.p. Injektion

	Fraktion						Spez. Aktiv. (Zpm/mg)
	Aktivität (Zpm)		Eiweiß (mg)				
	Leber	Thymus	Leber	Thymus			
Kernfraktion	30874	905	87,1	13,9	354	65	
Mitochondrien	70813	3272	96,6	15,3	733	214	
Mikrosomen	11344	16224	73,1	10,9	155	1488	
Cytoplasma	37110	735	237,0	37,8	156	4,7	
Summe	150411	21136					
% der einges.	80	119					
Dosis wiedergef.							

nutzte Tumor bei der Maus eine Immunantwort hervorrief.

4.5. Die Immunantwort der Maus auf die von uns benutzten Tumore

Im Laufe unserer Untersuchungen stellten wir eine Gewichtszunahme der Milz einer tumortragenden Maus (7 - 8 Tage nach Inoculation) fest (Abb. 12). P. SCHEURLÉN et al. (144) hatten dies für den Ehrlich Karzinom solid bereits beschrieben. Beim Ehrlich Ascites Tumor fanden wir im Gegensatz zu ihnen ebenfalls eine Milzvergrößerung.

Diese Diskrepanz läßt sich eventuell mit dem unterschiedlichen Alter des Tumors erklären. Wir beobachteten die Veränderung der Milz bis 8 Tage nach Inoculation der Zellen. P. SCHEURLÉN et al. trafen ihre Feststellung 16 Tage nach Überimpfen der Tumorzellen.

Die Vergrößerung der Milz ist auf eine Zunahme der kernhaltigen Zellen zurückzuführen. Dieses wird als eine Immunantwort des Organismus gewertet (144). Einen weiteren Hinweis erhielten wir beim Vergleich der Milzausstriche von gesunden und tumortragenden Mäusen (7 Tage nach Inoc.). In der Milz einer gesunden Maus waren ausschließlich unstimulierte Lymphozyten zu sehen. Die Milz der tumortragenden Maus enthielt außerdem große immunkompetente Zellen.

Auf eine Abbildung der Milzausstriche wurde verzichtet, weil die schwarz-weiß Aufnahmen die Färbung der Zellen nicht wiedergeben und deshalb nicht beweiskräftig sind.

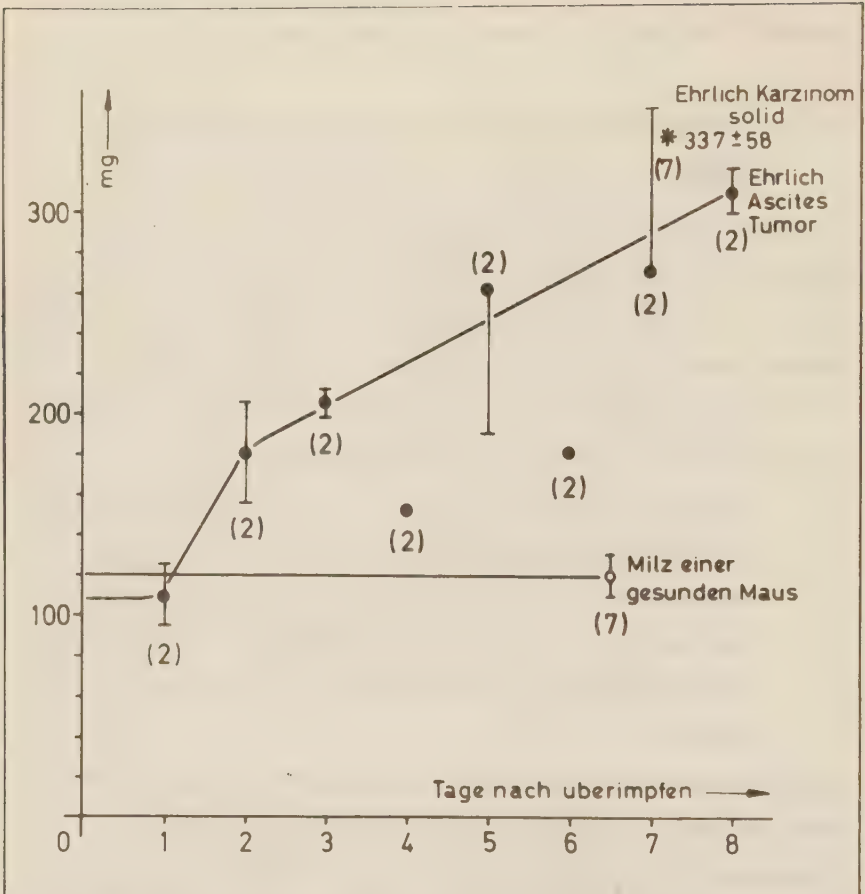


Abb. 12: Milzgewichte von Mäusen nach überimpfen
von Tumorzellen f (t)

Eine Ehrlich Ascites Tumorzell-Suspension wurde 7 Tage p. inoc. aus dem Bauchraum einer Maus gewonnen (E. 4.1.). Gesunde Mäuse wurden mit 0,3 ml dieser Suspension beimpft.

Mit den nächsten Versuchen sollten zunächst weitere Aussagen über das biochemische Verhalten von Cinnamoyl-Rc getroffen werden. Drei Punkten schenken wir eine besondere Aufmerksamkeit:

1. Läßt sich die hohe Aktivitätsanreicherung im Thymus beeinflussen; d.h. eventuell noch erhöhen?
2. Zu welchem Zeitpunkt p. inj. ist die höchste Anreicherung im Thymus?
3. Welche Dosierung gibt die höchste Radioaktivitätskonzentration im Thymus?

Wir gingen als erstes der Frage nach, ob man die hohe Anreicherung des Cinnamoyl-Rc im Thymus irgendwie beeinflussen kann.

4.6. Die Anreicherung des Cinnamoyl-Ruthenocen im Thymus nach Beeinflussung des Organs mit Cortison

Die am weitesten verbreitete Art, auf das lymphatische Gewebe und damit auch auf den Thymus einzuwirken, ist die Injektion von Glukocorticoiden. Diese Substanzklasse hemmt unter anderem die Tätigkeit des lymphatischen Gewebes (152 - 155).

Das Gewicht des Thymus wurde nach Gabe von Cortison erheblich reduziert (Tab. 13), was mit Befunden von G. KUSCHINSKI (152) übereinstimmt.

Die Konzentration von ^{103}Ru -Cinnamoyl-Rc pro Gramm Organ blieb allerdings gleich. Die spezifische Aktivität der Substanz im Thymus ließ sich durch Cortison nicht verändern.

Tab. 13: Anreicherung von Cinnamoyl-Rc im Thymus vonMäusen

Vorbehandlung: Cortison 100 mg/kg suspendiert in
 0,2 ml 0,9 % iger NaCl (i.p.), 48 Std. vor i.p. Injek-
 tion der Substanz, getötet: 24 Std. nach Injektion
 der Substanz. %/% Gewicht: $\frac{\% \text{ der inj. Dosis}}{\% \text{ Anteil des gewog. Organs am Körpergew.}}$

		Kontrolle	+ Cortison	infantile Tiere ^o
injiz.	µCi/kg	15	16,7	5,0
Dosis	µMol/kg	22	2,7	4,2
n		35	7	7
Thymusgewicht (% vom Körpergew.)		0,27 ± 0,03	$\xrightarrow{x}$ 0,098 $\xleftarrow{x}$ ± 0,034	$\xrightarrow{x}$ 0,413 $\xleftarrow{x}$ ± 0,041
Thymus-	% der inj. Dosis/g	45,5 ± 17,9	32,3 ± 16,7	29,8 ± 12,7
Aktivität.	%/% Gewicht	11,5 ± 4,1	8,6 ± 4,5	2,7 ± 1,1

^oca. 20 Tage alt

x signifikant (t-Test, p: 0,001)

Parallel zu diesen Versuchen testeten wir auch die Substanzanreicherung im Thymus juveniler Mäuse, bei denen die Thymustätigkeit besonders ausgeprägt ist (96). Das Organ ist bei ihnen im Verhältnis zum Körpergewicht größer als bei alten Tieren (Tab. 13).

Die Anreicherung der Verbindung war im aktiven jungen Thymus wie im ausgewachsenen "normalen" und im durch Cortison blockierten Organ jeweils gleich (Tab. 13).

Die zweite biochemische Fragestellung unterteilten wir in drei Punkte:

1. Wie schnell reichert sich die Substanz in den Organen an?
2. Wann reichert sich Cinnamoyl-Rc am stärksten im Thymus an?
3. Wie groß ist die Verweildauer der Verbindung in den Organen?

4.7. Zeitabhängigkeit der Organanreicherung von Cinnamoyl-Ruthenocen

Die Aktivität in der Leber und der gesamten Maus fielen parallel ab (Abb. 13), welches für eine dominierende Rolle der Leber bei der Ausscheidung der Verbindung sprach. Das wurde durch einen früheren Befund (Tab. 2) bestätigt, denn etwa 90 % der Substanz wurden über die Faeces ausgeschieden.

Aus Muskel und Blut wurde Cinnamoyl-Rc rasch eliminiert.

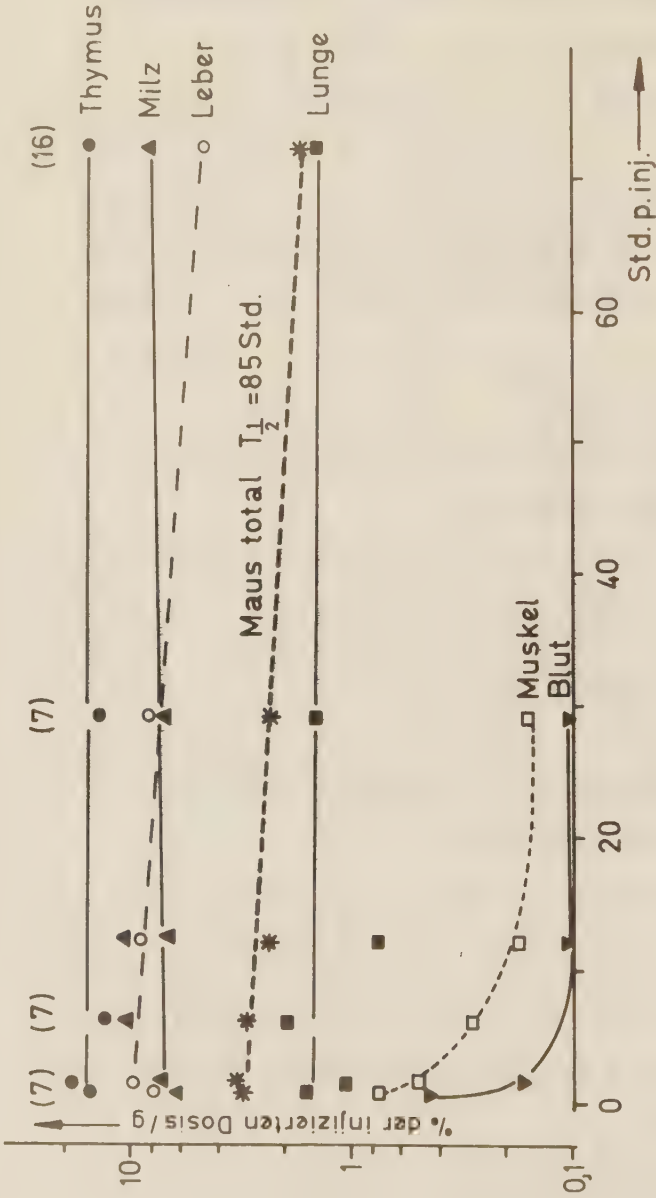


Abb. 13: Organaffinität von Cinnamoyl-Rc_f(t)

injiz. Dosis/Maus : 3 - 6 μ Mol/kg, 3,6 - 7,2 μ Ci/kg (i.p.), relativer Fehler
im Durchschnitt 40 %, beim Thymus 60 %

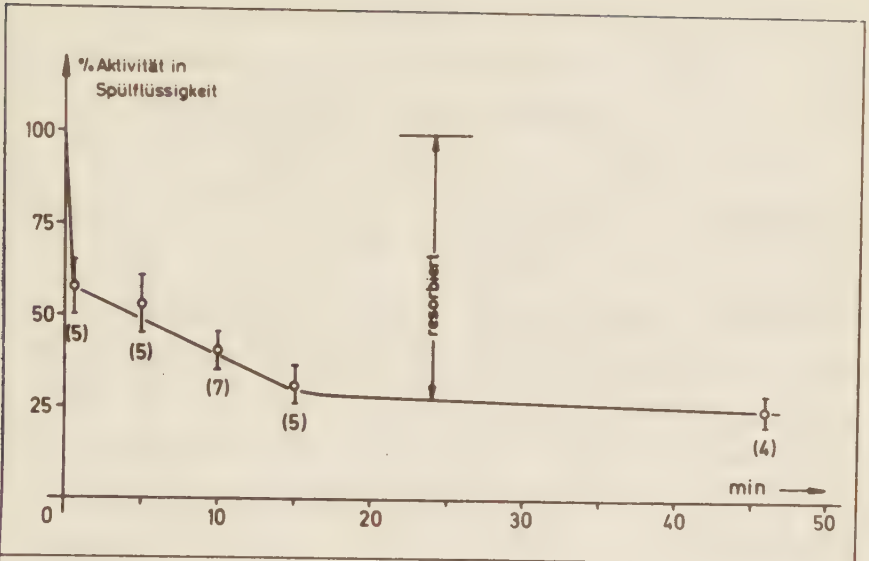


Abb. 14: Resorption von Cinnamoyl-Rc aus dem Peritoneum von Mäusen f (t)

injiz. Dosis : 1,7 $\mu\text{Mol/kg}$, 2,1 $\mu\text{Ci/kg}$ (i.p.)

100 % Aktivität in Spülflüssigkeit = inj. Dosis

Der Bauchraum der getöteten Maus wurde in einer Länge von 2 cm geöffnet und 3 mal mit 2 ml

Spülflüssigkeit (PO_4 -Puffer 0,025 m mit 7 % Albu-

min) ausgespült. Die Spülflüssigkeit wurde im

Bohrlochkristall gemessen und die erhaltenen

Werte zur injizierten Dosis in Beziehung gesetzt.

Dagegen war es in Lunge und im besonderen Maße im Thymus und Milz lange nachzuweisen. Das hohe Retentionsverhalten der Verbindung in einigen Organen des RES-Systems deutete auf einen zellulären Transport des Cinamoyl-Rc im Blut hin, denn in diesen Organen werden Leukozyten vom Körper abgelagert.

Die Versuche ließen vermuten, daß Cinnamoyl-Rc schnell aus dem Peritoneum resorbiert wurde. Das konnte mit einer anderen Methodik bestätigt werden (Abb. 14), selbst wenn man bedenkt, daß nicht die gesamte Substanz, die sich noch im Bauchraum befand, herausgespült werden konnte.

Im folgenden versuchten wir, mit einer veränderten Dosierung die Affinität der Verbindung zum Thymus und damit die Aktivität in den Thymozyten zu erhöhen.

4.8. Die Organaffinität von Cinnamoyl-Ruthenocen als Funktion der injizierten Substanzmenge

Mit steigendem Angebot nahmen Leber, Milz und Thymus Cinnamoyl-Rc in immer größerem Maße auf (Abb. 15).

Man beachte: Ein zur Abszisse paralleler Kurvenverlauf bedeutet, daß das Organ einen konstanten Prozentsatz der angebotenen Substanz aufnimmt.

Eine Sättigung dieser Organe mit Cinnamoyl-Rc deutete sich noch nicht an. Lediglich die Aufnahmefähigkeit der Lunge schien ab 17 $\mu\text{Mol/kg}$ erschöpft zu sein.

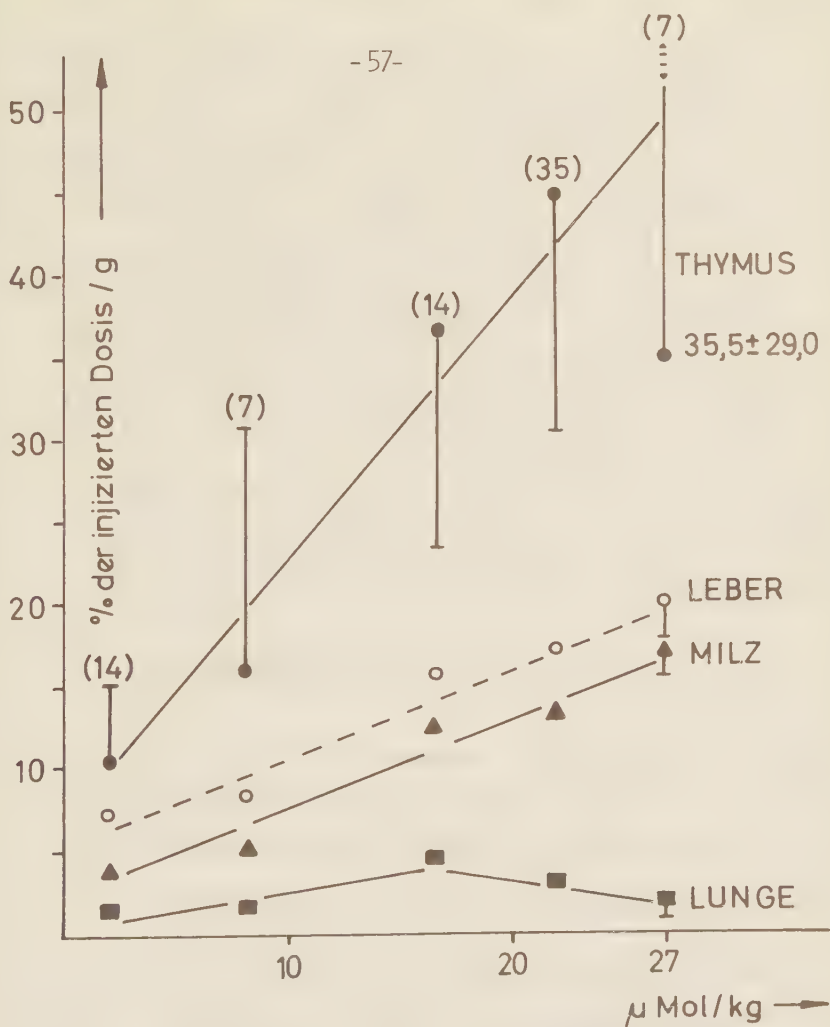


Abb. 15: Organverteilung von Cinnamoyl-Rc in Mäusen f(C)

getötet : 24 Std. nach i.p. Injektion

Während der Versuchsreihe wurden die Tiere beobachtet. Sie behielten nach der Injektion ihre ursprüngliche Motilität. Auch verloren sie selbst nach hohen Gaben kein Gewicht. Die Organe wiesen in der Regel - makroskopisch - keinerlei Veränderungen auf. Daraus glaubten wir schließen zu können, daß bis zu einer Dosierung von $27 \mu\text{Mol/kg}$ (auf den Menschen übertragen etwa 0,5 g) Cinnamoyl-Rc nicht toxisch wirkte.

Abschließend sollte versucht werden, die hohe Thymus-affinität von Cinnamoyl-Rc für die radioaktive Tumordiagnose nutzbar zu machen.

4.9. Anreicherung von Cinnamoyl-Ruthenocen im Tumor?

Für diesen Versuch waren folgende Voraussetzungen erfüllt: Der injizierte Tumor sprach das Immunsystem der Maus an (4.5.). Darauf versuchten Lymphozyten die eingedrungenen Zellen abzukapseln (114 - 116).

Da bei Immunstimulation eine Auswanderung der Lymphozyten aus dem Thymus nachgewiesen worden war (142 + 143), konnte man vermuten, daß Thymocyten auch bei der immunologischen Abwehr gegen den Tumor beteiligt sind und daß diese dabei auch quantitativ eine Rolle spielen (Tab. 8).

Es war nun die Frage, ob sich diese zum Teil markierten Zellen in dem entstehenden Tumor durch die radioaktive Strahlung lokalisieren lassen.

Im Tumorbein war über einen Zeitraum von 1 - 3 Tagen nicht signifikant (t - Test) mehr Aktivität als im gesunden Bein (Tab. 14) festzustellen.

Die Thymusanreicherung von Cinnamoyl-Rc, die bei einer massiven Auswanderung der Lymphozyten zum Tumor drastisch zurückgehen müßte, blieb konstant. Dieses negative Ergebnis konnte mehrere Ursachen haben:

1. Der Effekt war zu klein. Da der Tumor im Untersuchungszeitraum noch nicht zu sehen war, wurde ein großer Teil des Beines amputiert. Der gesunde Teil nivelliert einen eventuell vorhandenen Effekt (Vergrößerung des "Null-Effektes").
2. Aus dem Thymus wandern keine Lymphozyten aus.
 - a) In der Literatur waren widersprüchliche Angaben zu finden. D. METCALF (96) behauptet, daß 95 % der im Thymus befindlichen Lymphozyten auch dort zu Grunde gehen. D.D. JOEL (142) und A.D. CHANANA (143) wiesen dagegen eine massive Auswanderung der Zellen aus dem Thymus nach.
 - b) Lymphozyten, die mit Cinnamoyl-Rc markiert worden waren, blieben im Thymus. Andere Thymozyten wanderten bei der Immunstimulation aus.

Tab. 14: Anreicherung von Cinnamoyl-Rc in
einem Tumorbein f (t)

eingesetzte Dosis (i.p.) pro Maus: 6,7 μ Mol/kg
 8 μ Ci/kg, n: 2, Tumor: Ehrlich Karzinom solid,
 wurde gleichzeitig mit der Substanz gegeben

t (Std)	% der injiz. Dosis/g Tumor		
	24	48	72
Kontrollbein	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,03
Tumorbein	x ↓ 0,15 ± 0,02	x ↓ 0,19 ± 0,19	x ↓ 0,15 ± 0,15
Tumorbein	1,18	x 1,76	1,40
Kontrollbein	± 0,40	x ± 1,1	x ± 0,68
Thymus	16,2 ± 22,7	14,1 ± 11,4	12,4 ± 9,5

x Unterschiede nicht signifikant

C. DISKUSSION

1) Ausscheidung und Organverteilung (Kap. B. 2-B. 3.1.)

Die Ausscheidung (Tab. 2; Abb. 1 + 2) und Organverteilung (Tab. 3) der untersuchten Ruthenocenderivate stimmten mit Werten von D. LANGHEIM (2) und E. NIPPER (3) überein.

Die Ausscheidungsrate der Metallocene war beträchtlich höher als die von RuCl_3 (Zureinigen Ausnahme Cinnamoyl-Rc siehe Seite 64). Dieses ließ darauf schließen, daß das Ringsystem der organischen Substanzen im Organismus nicht oder nur teilweise zerstört wurde. Man hätte sonst für die Rc-Derivate die gleiche Ausscheidungskinetik wie für RuCl_3 erwartet.

Tumoraffinität

Von den untersuchten Ruthenocen-Derivaten reicherte sich nur der Rc-diester in etwa so stark im Tumor an wie der Vergleich Ga-citrat (Tab. 3), legt man die relativen auf den Muskel bezogenen Werte zugrunde. Für weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine Tumorszintigraphie sprach außerdem die geringe biologische Halbwertszeit (Abb. 2). Je schneller eine radioaktive Substanz den Körper verläßt, desto geringer ist die Strahlenbelastung für einen Patienten.

Für eine Tumorszintigraphie ist aber nicht nur die relative sondern auch die absolute Anreicherung im malignen Gewebe von Bedeutung. Bei diesem Vergleich schneidet der Rc-diester um den Faktor 100 schlechter als die gebräuchlichen Radiopharmaka ab (Tab. 15). Das kommt auch im Tumorindex zum Ausdruck, der die relativen (in Tab. 15 auf Blut bezogen, da die Literaturwerte sich auf Blut beziehen) mit den absoluten Werten verbindet.

Tab. 15: Vergleich von Radiopharmaka zur Tumorlokalisation

t = 24 Std. war jeweils der höchste Wert für Literaturbefunde

Verbindungen	% der injiz. Dosis/g Tumor (A)	Ipm/mg Tumor Ipm/mg Blut (B)	Tumorindex (A • B)	Literatur
Ga-citrat	2,5	0,88	2,2	73
Ga-citrat	3,5	1,2	4,2	eigene Befunde
InCl ₃	1,1	0,64	0,73	73
	2,2 *)	0,46 *)	1,1 *)	
HgCl ₂	3,1	3,3	10	73
Rc-diester	0,023	1,5	0,03	eigene Befunde

*) t = 4 Stunden

2) pH - Verschiebung (Kap. B. 3.2.)

Die Metalloccen-carbonsäuren penetrierten im Sauren signifikant stärker (Tab. 5) in die Zelle als im alkalischen Milieu.

Ähnliche Arbeiten hatten L.S. DIETRICH et al. (95) mit ^{14}C -Nicotinsäure durchgeführt. Bei pH 6,15 fanden sie etwa drei mal so viel Aktivität in den Zellen wie bei pH 7,5.

Obwohl sich innerhalb des untersuchten pH-Bereiches der Dissoziationsgrad der Metalloccen-carbonsäuren etwa um den Faktor 8 änderte (nach Henderson-Hasselbalch berechnet), war die Resorption der Verbindungen in die Zelle nur um den Faktor 2 erhöht. Eine mögliche Erklärung könnte die Veränderung der Zellmembran bei unphysiologischen pH-Werten sein. Die Durchlässigkeit der Membranen für Substanzen wird dadurch beeinflusst. Das könnte auch erklären, warum die Kontrollen im physiologischen Bereich die meiste Aktivität aufwiesen.

3) Die Anreicherung von Cinnamoyl-Ruthenocen im Thymus

Die hohe ^{103}Ru -Aktivität im Thymus (Tab. 8 + 9) nach Gabe von ^{103}Ru -Cinnamoyl-Rc war interessant, weil bisher keine so thymusaffine Substanz beschrieben worden ist. Die gute Darstellung des Organs auf autoradiographischen Aufnahmen (Abb. 5) läßt zum ersten Mal eine Szintigraphie des Thymus für möglich erscheinen. Dabei ist es

vorteilhaft, daß nach Injektion von Cinnamoyl-Rc kein anderes Organ im Thorax-Bereich eine hohe Substanzkonzentration aufweist (Tab. 9 und Abb. 5b + c). Die Ergebnisse der "Thymusbefunde" waren mit einem hohen relativen Fehler behaftet (z.B. Tab. 8). 20 % der Einzelwerte wiesen oft keine Thymusanreicherung auf. Die Affinität zu den anderen Organen hielt sich dagegen im Rahmen der normalen Standardabweichungen. Diese Beobachtung könnte möglicherweise durch die Autoradiographie erklärt werden. Nur ein kleiner Teil des Organs war stark markiert (Abb. 5 + 6). Man kann sich vorstellen, daß beim Herausschneiden des Thymus der gut markierte Abschnitt nicht herausgetrennt wurde, zumal sich dieser am Rande des Organs befand.

Stabilität der Verbindung

Cinnamoyl-Rc und RuCl_3 wurden in etwa gleich schnell ausgeschieden (Abb. 1). Die Verbindung zerfiel in Propylenglycol bei Lichteinwirkung (Abb. 16).

Diese beiden Befunde könnten zu dem Schluß führen, daß Cinnamoyl-Rc im Organismus nicht stabil ist und zu anorganischem Ruthen abgebaut wird. Dann aber hätte man nach Injektion von Cinnamoyl-Rc die gleiche Organverteilung wie nach Gabe von RuCl_3 finden müssen. Das war nicht der Fall.

Tab. 16: Organverteilungsmuster nach Injektion von Cinnamoyl-Rc
und RuCl₃

Werte aus Tab. 3 abgeleitet

	% der injizierten Dosis/g				
	Muskel	Lunge	Leber	Niere	Leber/Niere
Cinnamoyl-Rc	0,14	2,3	11	0,5	22
RuCl ₃	0,58	1,7	4,0	4,7	0,85

Der große Unterschied im Leber/Niere Quotient läßt sich durch das Kot/Harn Aktivitäts-Verhältnis bei der Ausscheidung der beiden Verbindungen belegen. Innerhalb der ersten 24 Std. nach Injektion liegt es beim Cinnamoyl-Rc bei 9 : 1 (Tab. 2). RuCl₃ weist ein genau umgekehrtes Verhältnis auf. Nur 1/5 der ausgeschiedenen Aktivität wurden über die Faeces eliminiert (2).

Aus den genannten Gründen läßt sich ableiten, daß Cinnamoyl-Rc im Organismus nicht oder nur geringfügig zu anorganischem Ruthen abgebaut wird.

Diese Feststellung erscheint wichtig, weil M. WENZEL (bei Korrektur dieser Arbeit) nach Gabe von $^{103}\text{RuCl}_3$ Aktivität (11 %/g; vergleichbarer Wert für Cinnamoyl-Rc 13 %/g) im Thymus von Mäusen gefunden hat. In einem gewissen Widerspruch dazu steht eine Autoradiographie einer Ratte nach Injektion von RuCl₃, die keine Substanz

im Thymus erkennen ließ (2). Doch läßt sich hier nachträglich nicht feststellen, ob das Organ überhaupt angeschnitten war.

4) Die Verteilung von Cinnamoyl-Rc in Mäusen nach i.p. i.v. und i.m. Injektion (Kap. 4.3.)

Nur nach intraperitonealer Gabe ließ sich Cinnamoyl-Rc im Thymus von Mäusen, Ratten und Meerschweinchen (Tab. 9) nachweisen. Nach i.v. und i.m. Injektion wurde dort nur wenig Substanz gefunden.

Eine Erklärung dieser Befunde setzt die Kenntnis voraus, was nach i.v. bzw. i.p. Injektion mit einer Verbindung im Organismus geschieht: i.p.: Das Peritoneum ist von einem Kapillarnetz umgeben. Die Verbindung wird von diesen Gefäßen aufgenommen, die alle in direkter Beziehung zum portalen Kreislauf stehen. Sie gelangt von dort direkt in die Leber. Milz, Niere und Leber sind auch zur direkten Aufnahme der Verbindung befähigt, da sie sich innerhalb des Peritoneums befinden. Das dort befindliche Fett ist zu lipophilen Substanzen besonders affin (Tab. 9). i.v.: Von der Injektionsstelle gelangt Cinnamoyl-Rc über das venöse Blut zunächst zum Herzen und zur Lunge. Von dort wird u.a. der Herzmuskel versorgt, der gut markiert war (Abb. 7). Von der Lunge gelangt ein Teil des Blutes in die Milz, ein anderer Teil in die Leber und dann in den gesamten Organismus.

Was könnte der Grund für die hohe Thymusaffinität des Cinnamoyl-Rc sein, und warum konnte diese nach i.v. und i.m. Injektion nicht beobachtet werden? Folgende Erklärungen

wären denkbar:

1. Die Verbindung wird im Peritoneum an ein Transportsystem gebunden, das im Blut nicht oder nur teilweise vorhanden ist. Das Konjugat besitzt eine große Affinität zum Thymus. Nach i.v. Injektion wird die Verbindung im Blut an ein nicht thymusaffines Transportsystem gebunden.
2. Nach i.p. Injektion kommt die Substanz direkt in die Leber und wird dort an ein thymusaffines Transportsystem gebunden. Bei der i.v. Injektion muß Cinnamoyl-Rc auf dem Weg von der Schwanzvene der Maus in die Leber erst den großen und kleinen Kreislauf durchlaufen. Sie könnte auf diesem Weg schon soweit verändert werden, daß das anschließend in der Leber gebildete Konjugat nicht mehr thymusaffin ist.

In diesem Zusammenhang ist auch ein Befund von M. WENZEL (persönliche Mitteilung) zu erwähnen, der vor der i.p. Injektion von Cinnamoyl-Rc den Tieren Casein gespritzt hat. Die Thymusanreicherung ging um den Faktor 6 zurück. Man könnte das auf eine Beladung der Transportsysteme durch Casein zurückführen.

Die geringe Thymusaffinität bei neugeborenen Ratten (Tab. 10) wurde ursprünglich als eine fehlende Immunantwort gedeutet. Sie könnte also auf einen zellulären Transport aus dem Bauchraum hinweisen. Man kann diesen

Befund aber auch folgendermaßen interpretieren: Bei diesen Tieren ist das thymusaffine Transportsystem noch nicht ausgeprägt, so daß es zu keiner Anreicherung in diesem Organ kommen kann. Zu diesem Komplex könnte die Beantwortung einer Reihe von Fragen größere Klarheit bringen.

1. Warum wandert die Substanz ausschließlich in die Lymphozyten des Thymus? Da die lymphatischen Gewebe nicht in gleicher Weise wie der Thymus markiert sind, ist der - fast ausschließlichen - Markierung der Thymozyten in der Weise nachzugehen, daß geprüft werden müßte, ob es sich um eine "immunologische Antwort" des Organs handelt.
2. Führt die Substanz zu einer Lymphozytenproliferation im Thymus? Die Beantwortung dieser Frage würde uns einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Immunantwort des Thymus auf die Verbindung geben.
3. Kann eine zeitliche Abhängigkeit zwischen Leber- und Thymusmarkierung gefunden werden? Man sollte nach der Injektion erst einen starken Anstieg der Lebermarkierung erwarten, der eine Thymusmarkierung folgt. Im weiteren Verlauf müßte die Konzentration von Cinnamoyl-Rc in der Leber abfallen, während sie im Thymus konstant bleiben bzw. leicht ansteigen müßte (letzteres ist z.T. schon aus Abb. 13 ersichtlich).

4. Ist die Markierung nur einzelner Abschnitte des Thymus hämodynamisch oder funktionell bedingt?

Da wir eine Beziehung der Markierung zu Gefäßen festgestellt hatten (Abb. 6 + 10), wäre eher anzunehmen, daß die Verteilung hämodynamische Ursachen hat.

5. Nähere Untersuchungen über die Anreicherung des Cinnamoyl-Ruthenocen im Thymus (Kap. 4.6. - 4.9.)

Die Anreicherung von Cinnamoyl-Rc im Thymus war nach Blockade des Organs mit Cortison genauso hoch wie bei unvorbehandelten erwachsenen Mäusen und beim vergrößerten aktiven Thymus junger Mäuse (Tab. 13).

Demnach scheint die hohe Konzentration des Cinnamoyl-Rc im Thymus auf die Struktur und nicht auf die Funktion des Organs zurückzuführen zu sein. Dieser Befund kann in die Theorie über die Thymusanreicherung von Cinnamoyl-Rc passen, wenn man annimmt, daß die Stellen, die für die Aufnahme des Konjugates verantwortlich sind, im gleichen Maße wie das Gewicht des gesamten Organs zu- oder abnehmen. Cinnamoyl-Rc wurde aus dem Bauchraum rasch aufgenommen (Abb. 14 + 15). Ein Versuch (nicht aufgeführt) zeigte bereits 10 Min. p. inj. dieselbe Anreicherung im Thymus wie nach 45 Min.

Dieser Befund spricht nicht für eine Phagozytose der Verbindung im Peritoneum mit anschließendem Transport

zum Thymus, da dieser Mechanismus vermutlich länger als 10 Min. gedauert hätte. Dadurch wurden die autoradiographischen Befunde unterstützt, die keine Aktivität in den Granulozyten des Blutes erkennen ließen.

Nicht in das Bild paßten dagegen die hohe Anreicherung und die lange Retention des Cinnamoyl-Rc in den Organen des Reticulo-endothelialen Systems (RES). Da die Organe des RES den Ablagerungsort für Leukozyten darstellen, deuten diese Befunde eher auf einen zellulären Transport der Substanz im Blut hin.

Über einen Zeitraum von 1 - 3 Tagen war in einem Tumor nicht mehr Aktivität auszumachen als in einer vergleichbaren Menge Muskel (Tab. 14). Dieses wäre aus folgenden Gründen zu erwarten gewesen:

- A. 1. Es ist bekannt, daß markierte Lymphozyten bei Immunstimulation durch entstehende Tumore in das maligne Gewebe einwandern (114 - 116).
 - 1a. Cinnamoyl-Rc befand sich im Thymus innerhalb der Lymphozyten (Abb. 11).
 - 1b. Bei Immunstimulation wandern aus dem Thymus massiv Lymphozyten aus.
(142 + 143) (Vergl. aber B. 1)
 - 1c. Quantitativ spielen die Thymozyten (11 % der gesamten Lymphozyten) bei der Immunabwehr eine Rolle.

1d. Ehrlich Karzinom solid spricht das Immunsystem der Mäuse an (Abb. 12).

Folgende Gründe könnten erklären, warum der entstehende Tumor mit Hilfe von markierten Lymphozyten nicht nachgewiesen werden konnte.

- B. 1. D. METCALF (96) beobachtete keine Auswanderung von Lymphozyten aus dem Thymus (Vergleiche aber A. 1b.)
2. Die Thymozyten spielen quantitativ zwar eine Rolle bei der Immunabwehr, da jedoch nur ein kleiner Teil von ihnen markiert war, lassen sich diese mit unserer Methode noch nicht nachweisen.
3. Aus dem Thymus wandern nur unmarkierte Zellen aus.
4. Der Tumor war im Untersuchungszeitraum noch nicht zu sehen. Deshalb mußte zur Sicherheit ein großer Teil des gesunden Beines mit amputiert werden. Dadurch vergrößerte sich der "Null-Effekt".
5. Im lebenden Organismus soll der Tumor Antikörper bilden, die die Körperabwehr schwächen (117 - 121).

D. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich die 1951 entdeckte Stoffklasse der Metallocene für die Entwicklung neuer Radiopharmaka - insbesondere zur Tumordiagnose - eignet.

Im ersten Teil wurden daher zunächst einige ausgewählte Ruthenocene auf ihre Organ- bzw. Tumoraffinität geprüft. Diese wurde mit Ga-citrat, einem Standardmittel in der radioaktiven Tumordiagnose, verglichen. Die Vergleiche zeigten - mit Ausnahme des Rc-diester - keine besondere Eignung der Metallocene für die Tumorszintigraphie. Bei näheren Untersuchungen wies der Rc-diester allerdings zu keinem Zeitpunkt (zwischen 0 und 3 Tage) eine höhere Anreicherung im Tumor als Ga-citrat auf. Ferner wurde die metallorganische Verbindung aus dem Tumor genau so schnell wie aus allen anderen untersuchten Organen eliminiert.

Ein höheres Retentionsvermögen des malignen Gewebes für die ^{103}Ru -Aktivität im Vergleich zu den übrigen Organen aber wäre für eine radioaktive Tumordiagnose notwendig gewesen, da sich die Substanz nicht per se stark im Tumor anreichert.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde geprüft, ob Fc- und Rc-carbonsäure nach Senkung des pH verstärkt in Tumorzellen penetrieren. Die Verbindungen reicherten sich im übersäuerten Gewebe (pH = 6) um den Faktor 2 stärker

als bei pH 7,4 an. Obwohl signifikant, war der Unterschied für weitere Untersuchungen zu gering.

Besonders interessant waren Befunde mit Cinnamoyl-Rc, welches in hoher Konzentration (45,5 %/g) in Thymusdrüsen von Mäusen und Meerschweinchen nachgewiesen wurde. Bisher ist keine so thymusaffine Substanz beschrieben worden.

Das Organ konnte erstmals mit dieser radioaktiven Verbindung auf einer Ganzkörperautoradiographie dargestellt werden. Andere Rc-Derivate (auch mit ähnlicher Phenylpropenon-Struktur) zeigten keine hohe Thymusanreicherung.

Cinnamoyl-Rc befand sich im Thymus innerhalb der Lymphozyten. Die hohe Substanzkonzentration in diesem Organ konnte jedoch nur nach i.p. nicht aber nach i.v. oder i.m. Injektion nachgewiesen werden. Die Verbindung wurde sowohl nach i.p. als auch nach i.v. Injektion vermutlich nicht phagozytiert.

Im Rahmen der weiteren biochemischen Untersuchungen wurde eine schnelle Aufnahme von Cinnamoyl-Rc in den Thymus bewiesen. Die Anreicherung blieb von 45 Min. bis 3 Tage konstant.

Durch Gabe von Cortison ließ sie sich nicht beeinflussen. Mit steigendem Angebot (bis 27 $\mu\text{Mol/kg}$) nahm der Thymus die Verbindung gut auf. Sie schien auch bei hoher Dosierung nicht toxisch zu sein.

Ein wichtiges Ziel innerhalb dieser Untersuchungen war es, mit Hilfe von Thymozyten, Fremdgewebe, wie etwa einen entstehenden Tumor, radioaktiv zu markieren. Es ist bekannt, daß Lymphozyten bei einer Immunabwehr des Körpers in Tumore einwandern, um diese abzukapseln. Alle Experimente mit Cinnamoyl-Rc ergaben aber nur unwesentlich mehr ^{103}Ru -Aktivität im Tumor als im Muskel.

E. MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere

1.1. Mäuse - weibliche Albinomäuse (CF₁), 4-8
Wochen alt, ca. 25 g, geschlechtsreif

1.2. Ratten - weibliche Wistarratten:
14 Wochen alt, ca. 200 g, geschlechtsreif;
5 Tage alt ca. 8 g, infantil
beideaus der Zucht der Fa. Hagemann, Extertall
Ernährung: Altrumin, Wasser ad lib.

1.3. Meerschweinchen - weibliche Rosetten-Meer-
schweinchen, 2 bis 6 Wochen alt, 170 bis
300 g, ab 21. Tag geschlechtsreif
aus der Zucht des Mikrobiologischen Institutes
der FU Berlin
Ernährung: Vitakraft Meerschweinchen-Futter
Wasser ad lib.

Tumortragende Tiere

- 1.4. Mäuse mit Ehrlich Ascites Tumor (Stamm Dahlem)
- Pharmazeutisches Institut der FU Berlin -
- 1.5. Mäuse mit Ehrlich Karzinom solid
- Fa. Hoechst AG, Frankfurt / M. -

Für die Überlassung des Ehrlich Karzinom solid bin
ich Herrn Dr. Gehricke von der Fa. Hoechst AG zu
Dank verpflichtet.

2. Geräte

Folgende Kernstrahlungsmeßgeräte fanden Verwendung:

Gammascint, Fa. Berthold, Wildbad

Gammameßplatz (Ganztiermeßplatz), bestehend aus elektronischen Bausteinen der Fa. Berthold.

Beide Geräte besaßen ein NaJ-Bohrloch-Kristall von 3 mal 3 Zoll Größe.

DC Scanner II mit Autochronschreiber, Fa. Berthold

UV-Messungen führten wir mit einem Beckman DB-Grating Spektrophotometer bzw. einem Zeiss M 40 II-PMQ II durch.

Ehrlich Ascites Tumorzellen wurden in einem Schüttelwasserbad 3047 der Fa. Köttermann inkubiert. Als Laborzentrifuge diente die LABOFUG I der Fa. Heräus.

Die Herstellung von morphologischen Zellfraktionen erfolgte mit einer Beckman Spinco Ultrazentrifuge mit Festwinkel Rotor Typ Titan 50.

Zum Homogenisieren von Lebergeweben wurde ein Potter Elvehjem Homogenisator benutzt. Zum Homogenisieren von Thymus ein Atommixmill.

Bei der radioaktiven Markierung wurden die Ampullen in einem Haacke Ultrathermostat mit Silikonöl erhitzt.

3. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten, wenn nichts anderes angegeben, den Reinheitsgrad "pro analysi". Soweit notwendig, wurden die Substanzen zusätzlich chromatographisch gereinigt oder umkristallisiert. Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch destilliert und unter Lichtschutz aufbewahrt.

3.1. Inaktive Metallocen-Verbindungen

Ferrocen	- Merck AG, Darmstadt
Fc-COOH	- Makor Chemicals Ltd., Jerusalem, Israel
Ruthenocen	- Strem Chemicals Inc., Danvers, Mass., USA
Rc-COOH	- Serva International, Heidelberg
Fc-COCH ₃	- "
Fc-(COCH ₃) ₂	- "
Fc-CONH ₂	- Pharmazeutisches Institut der FU Berlin
Fc-COOCH ₃	- "
Fc-(COOCH ₃) ₂	- "
Fc-COCH=CHC ₆ H ₅	- "

3.2. $^{103}\text{Ru}-\text{RuCl}_3$ - Fa. Isotopen GmbH, Srendlingen

Es handelte sich um eine Lösung in 10 n-HCl.
Bezogen wurden mehrfach 10 mCi. Das Volumen
schwankte zwischen 2,2 und 5,3 ml, die spezi-
fische Aktivität zwischen 2,3 und 7,9 Ci/g.

Reaktor: I.R.E. c/o SCK-CEN

Boeretang 200

2400 Mil/Belgien

3.3. Bei den verwendeten Ruthenocen-Verbindungen
handelt es sich um die von uns erstellten
Mischungen aus Ferrocen- und $^{103}\text{Ruthenocen-}$
Verbindungen. Alle " $\mu\text{Mol/kg}$ " Angaben beziehen
sich auf beide Komponenten.

3.4. Für die Dünnschicht-Chromatographie benutzten
wir Platten der Fa. Woelm, Rapid S 102 F 254

3.5. Die Säulenchromatographie wurde mit basischem
und neutralem Al_2O_3 , Woelm, der Aktivitätsstufe
II durchgeführt.

3.6. Der verwendete PO_4 -Puffer (0,025 m) hatte
folgende Zusammensetzung:

NaCl	-	0,147 Mol
KCl	-	0,006 "
$\text{MgSO}_4 \bullet 7 \text{H}_2\text{O}$	-	0,001 "
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$	-	0,021 "
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$	-	0,004 "

4. Methoden

4.1. Allgemeine Angaben

Ehrlich Ascites Tumor wurde durch regelmäßige Transplantation auf weiblichen CF₁ Mäusen gehalten. Die Zellen wurden 6 - 9 Tage nach der Transplantation mit einer Kanüle aus dem ungeöffneten Bauchraum der Tiere gewonnen und anschließend ungewaschen je 0,3 ml Suspension auf gesunde Tiere überimpft.

Ehrlich Karzinom solid wurde durch regelmäßige Transplantation auf weiblichen CF₁ Mäusen gehalten. Der herauspräparierte Tumor mit einem Durchmesser von etwa 3 cm wurde mit 2 ml Puffer durch ein geeignetes Sieb gepreßt.

0,1 ml der erhaltenen Zellsuspension wurde in den Oberschenkel der Tiere gepritzt. Die Transplantation fand unter aseptischen Bedingungen statt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei den biochemischen Untersuchungen weibliche CF₁ Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 25 g (23 - 30g) verwendet. Futter und Wasser standen während der Versuche durchgehend zur Verfügung.

Die zu injizierenden Metalloccen-Derivate waren in 1,2 Propylenglykol bzw. in 90%igem Äthanol gelöst. Gespritzt wurden:

Mäusen maximal 50 µl; Ratten und Meerschweinchen bis 150 µl.

Die Halbwertszeit der Verbindungen wurde berücksichtigt. Alle Werte wurden auf $t = 0$ zurückgerechnet.

4.2. Herstellung der radioaktiven Ruthenocene

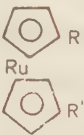
Der Gang der Markierung gliederte sich in:

1. Herstellung einer Mischung aus Ferrocen-Derivat und aktivem $^{103}\text{RuCl}$
2. Wärmebehandlung der Ampulle
3. Aufarbeitung der Probe

Zu 1: Die radioaktive $^{103}\text{RuCl}_3$ -Lösung stellten wir einige Tage bei 10^{-2} Torr in einen Exsiccator über KOH, lösten den Rückstand in wenig Aceton, evakuierten nochmals und nahmen schließlich in einem definierten Volumen Aceton auf. Diese Lösung setzten wir für die Reaktion ein.

Voraussetzung für einen ausreichenden Austausch ist ein guter Kontakt von Ferrocen-Verbindung

Tab. 17: In der Arbeit benutzte Ruthenocen-Derivate

Formel	MG	Nomenklatur nach Iupac	von uns benutzte Abkürzungen
	231,26	Ruthenocen	Rc
R-COOH	275,2	Ruthenocen-carbon-säure	Rc-carbonsäure
R-CONH ₂	274,28	Ruthenocen-carbon-säureamid	Rc-carboxamid
R-COCH ₃	273,29	Acetyl-Ruthenocen	Acetyl-Rc
RR'-(COCH ₃) ₂	315,3	1,1'-Diacetyl-Ruthenocen	Diacetyl-Rc
R-COOCH ₃	289,28	Ruthenocen-carbon-säuremethylester	Rc-ester
RR'-(COOCH ₃) ₂	347,3	Ruthenocen-1,1'-dicarbonsäuredimethylester	Rc-diester
R-COCH=CHC ₆ H ₅	361,4	Cinnamoyl-Ruthenocen	Cinnamoyl-Rc
R-CH=CHCOC ₆ H ₅	361,4	('Benzoyl-vinyl)-Ruthenocen	Rc-phenylpropenon
R-SO ₂ NH ₂	310,3	Ruthenocen-sulfon-säureamid	Rc-sulfonamid

und Metallsalz. Das in diesem Zusammenhang von MEINHOLD (157) für die Metallacetone beschriebene Verfahren der absorptiven Mitfällung übertrugen wir auf die Metallocene. In der Regel gaben wir die Ferrocen-Verbindung als konzentrierte acetonische Lösung in das Reaktionsgefäß (getemperte Duran-Gläser, $\varnothing$ 1 cm, Länge 2 cm). Mit einer graduierten Einmalspritze setzten wir die gewünschte Aktivität in Form einer acetonischen Lösung zu, entfernten das Lösungsmittel und schmolzen die Ampulle bei 10^{-2} bis 10^{-3} Torr zu.

Zu 2: Die Proben wurden unter ständiger Bewegung - zur besseren Vermischung des Ru-Salzes mit dem Fänger - 1 bis 2 Stunden bei 180°C . im Ölbad erhitzt.

Zu 3: Aus der erkalteten Ampulle wurde der Inhalt mit Aceton herausgelöst und über eine Säule (Länge 20 cm, $\varnothing$ 1,0 cm) mit Al_2O_3 eine Vorreinigung erreicht. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingengt und die Verbindung durch DC gereinigt. Die Fraktion der gewünschten radioaktiven Verbindung wurde von der Dünnschicht-Chromatographie-Platte vorsichtig abgeschabt, eluiert und auf Reinheit geprüft (siehe auch 2, 3, 77).

Stabilität:

Cinnamoyl-Rc war im Gegensatz zu den meisten anderen Ruthenocenen relativ instabil. Es mußte unter Licht-

ausschluß in Benzol aufbewahrt werden. Sowohl in Äthanol als auch in Propylenglykol zersetzte es sich. In Abb. 16 wird gerade gereinigtes Cinnamoyl-Rc mit Substanz verglichen, die 4 Wochen in Propylenglykol gelagert war.

Der Ferrocen-Anteil zersetzte sich schneller als der Ruthenocen-Anteil, welches man an dem Farbwechsel der Lösung von rot (Cinnamoyl-Fc) nach gelb (Cinnamoyl-Rc) erkennen konnte (Wenzel, persönliche Mitteilung). Möglicherweise könnte man dadurch das inaktive Ferrocen-Derivat vollständig vom aktiven Ruthenocen-Derivat trennen und auf diese Weise die spezifische Aktivität drastisch erhöhen.

4.3. Ermittlung der Ausbeute und der spezifischen Aktivität

Die Ausbeute wurde wie folgt bestimmt. Ein Aliquot eines definierten Volumens des betreffenden Ruthenocens wurde mit einer Mikropipette entnommen, in einem NaJ-Bohrlochkristall gemessen und zur eingesetzten ^{103}Ru -Aktivität in Beziehung gesetzt.

Die für die Errechnung der spezifischen Aktivität benötigte Mengenbestimmung wurde kolorimetrisch im Vergleich zu Lösungen bekannter Konzentrationen inaktiver Verbindungen vorgenommen (siehe auch 2, 77).

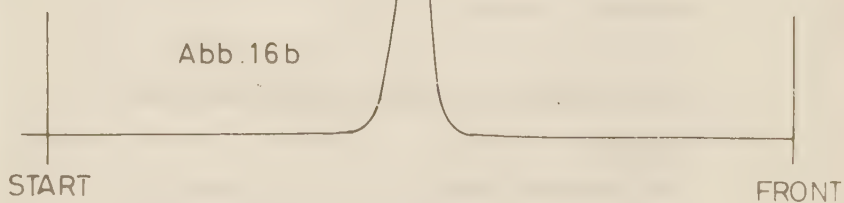
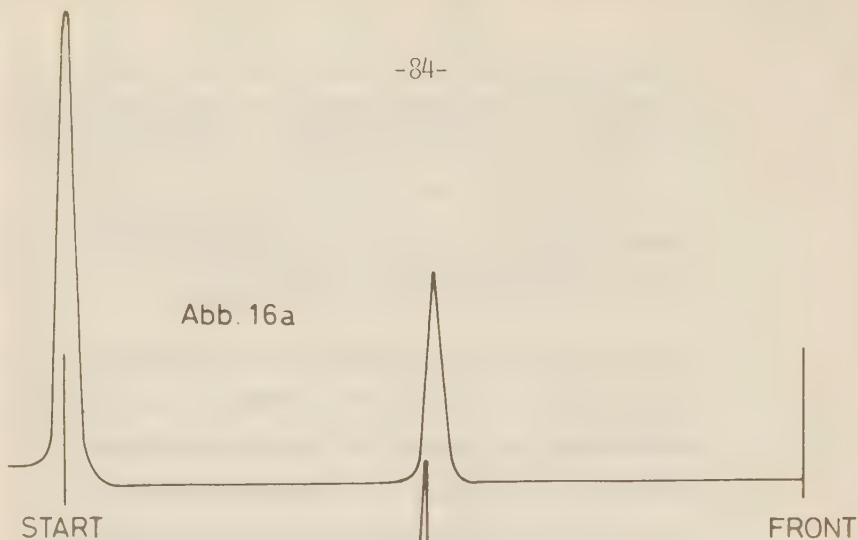


Abb. 16a: Scannerbild von Cinnamoyl-Rc nach 4 Wochen in
Propylenglycol

Maximum: 100 Ips, Dämpfung: 10, Vorschub: 100 mm/Std,
RF : 0,52

Abb. 16b: Scannerbild von gereinigtem Cinnamoyl-Rc

Maximum: 30 Ips, Dämpfung: 30, Vorschub: 60 mm/Std
RF : 0,49

Laufmittel jeweils: Benzol 9, Methanol 1

Tab. 18: Daten zur Synthese und Aufarbeitung einiger Ruthenocene
=====

Standardbedingungen 2 h, 180°C.

$\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$: Molangabe bedeutet: Fc + Rc Mischung

S Y N T H E S E

Fänger	Einsatz Fänger			Einsatz $^{103}\text{Ru}^{3+}$		Mol Fänger Mol rad. Metall	Radio- chem. Ausbeute	Spez. Aktivität $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$	AUFARBEITUNG
	mg	μMol	μCi	μg	μMol				
Fc-carboxamid	13,1	57,2	1000	380	3,7	15	43	13,3	Laufmittel Benzol 8/Methanol 2 RF - Wert
Fc-Acetyl	12	55	2500	11	0,12	458	48	16,1	0,24 0,56
Fc-Diacetyl	15,9	59	900	1000	10	6	18	14,0	0,44
Fc-ester	14,1	58	1000	370	3,7	16	45	14,9	0,61
Fc-diester	9,5	31	587	657	6,5	5	50	12,1	0,59
Cinnamoyl-Fc	20	63,2	1000	370	3,6	18	10	1,2	0,50 *)
Cinnamoyl-Fc	10	31,6	1000	350	3,4	9	8	2,2	0,49 *)
Cinnamoyl-Fc	20	63,2	2000	700	6,8	9	2	1,6	0,49 *)

*) Laufmittel Benzol 9 / Äthanol 1

4.4. Bestimmung der Ausscheidungsrate von ^{103}Ru -Rc-Verbindungen bei Mäusen

Die Mäuse wurden nach der Injektion in eine Kunststoffröhre gebracht, die den Körpermaßen erwachsener Mäuse angepaßt war. Diese wurde in ein NaJ-Bohrlochkristall geschoben und die noch vorhandene Aktivität gemessen. So war es möglich, durch beliebig oft vorgenommene Messungen ein genaues Bild der Ausscheidung zu erhalten.

Pro Substanz wurden 4 bis 7 Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden zwischen den einzelnen Messungen in normalen Tierkäfigen gehalten.

4.5. Bestimmung der Harn- und Kot-Ausscheidungsrate von ^{103}Ru -Rc-Verbindungen bei Ratten und Meerschweinchen.

Die Ratten bzw. Meerschweinchen wurden nach der Injektion einzeln in einen Stoffwechselkäfig der Fa. Vogel, Gießen gesetzt. Urin und Kot konnten darin getrennt aufgefangen werden. Nach der Versuchszeit wurden der Rost des Käfigs mit Wasser gespült und die Spülflüssigkeit zum Urin gegeben. Die Aktivitätsbestimmungen in Kot und Harn erfolgten im NaJ-Bohrlochkristall.

4.6.

Tab. 19: Verteilungsquotient einiger Ruthenocene und
von Ga-citrat in n-Octanol/Wasser

Substanz	pH	$\frac{\text{Ipm/ml n-Octanol}}{\text{Ipm/ml H}_2\text{O (Puffer)}}$	N
Rc-carbonsäure	3,0	17,4 + 0,4	5
	7,4	0,34 + 0,01	5
Rc- carboxamid	7,4	21,8 + 3,6	10
Rc-monoacetyl	7,4	23,7 + 0,5	5
Rc-diacetyl	7,4	21,8 + 3,9	10
Rc-monoester	7,4	85,9 + 8,5	5
Rc-diester	7,4	134,0 + 7,2	10
Rc-phenylpropenon	7,4	36,5 + 10,9	5
Cinnamoyl-Rc	7,4	318,4 + 29,8	5
Ga-citrat	7,4	5,8 + 1,9	5

eingesetzte Menge: PO_4 -Puffer 0,025 m 2 ml;

n-Octanol 2 ml

gemessene Menge: PO_4 -Puffer 0,025 m 1 ml;

n-Octanol 1 ml

eingesetzte μCi : 0,001 bis 0,1 = 0,04 bis 4,0 μg

Die Proben wurden 2 mal je 30 sec. mit dem Whirlimix durchmischt, und dann 3 Min. bei 3500 U/Min. zentrifugiert. Der 2. ml wurde vorsichtig abgehoben und verworfen. Dann wurde 1 ml Puffer abpipettiert und ebenfalls zur Messung gebracht. Die Aktivität wurde in 0,1 ml Propylenlykol-Lösung dazugegeben. Das zusätzliche Volumen blieb unberücksichtigt.

4.7. Bestimmung der Organverteilung applizierter Verbindungen

Nach Injektion der gewünschten Verbindung wurden die Tiere wie unter 4.4. oder 4.5. gehalten.

Nach den beabsichtigten Zeitabständen wurden sie mit CHCl_3 kurz betäubt, nach Öffnen der Bauchdecke mit einem Schnitt durch Zwerchfell und Herz getötet und sofort die gewünschten Organe bzw. Körperpartien entnommen. Die ausgebluteten und auf Filterpapier kurz abgetupften Gewebestücke wurden mit einer Pinzette in tarierte Reagenzgläser gebracht, sofort gewogen und im Gammaszint die Aktivität bestimmt. Es wurde darauf geachtet, daß möglichst nicht unter 1000 Impulsen gemessen wurde.

4.8. Bestimmung der Organverteilung mit Hilfe der Ganzkörperautoradiographie

Die Durchführung der ganzkörperautoradiographischen Untersuchung erfolgte in der Nuklearmedizinischen Abteilung der Schering AG.

Nach i.p. und i.v. Injektion wurden die Bestimmungen nach 24 Stunden vorgenommen. Methodisch wurde folgendermaßen vorgegangen: Die mit Äther betäubten Tiere wurden in eine Mischung aus Aceton und Trockeneis eingefroren und anschließend 24 Stunden in der Kühltruhe gehalten. Hierbei verflüchtigt sich das Aceton. Nach dem Entfernen der Extremitäten und Einbetten des Rumpfes in Schabefleisch wurden im Kryostaten bei -30°C 20 micron starke Längsschnitte erstellt und auf Folienmaterial (Scotch-Type der Fa. Drein) aufgezogen. Nach dem Trocknen der Schnitte in der Kühltruhe folgte das Auflegen des Filmes (Codirex-Röntgenfilm), die Exposition und das Entwickeln.

Bestimmung der Aktivitätsverteilung mit Hilfe der Mikroautoradiographie

Die Durchführung der mikroautoradiographischen Untersuchungen erfolgte im Anatomischen Institut der FU Berlin.

Die Organe wurden in Methanol/Eisessig 3 : 1

Die Blutausstriche wurden wärmefixiert.

Nach dem Einbetten der Organe in Paraplast wurden 5 μ starke Serienschnitte hergestellt und die Präparate entparaffiniert. Das Aufbringen der

Ilford K 5 Emulsion erfolgte nach der Dipping Methode im Verhältnis Emulsion/Wasser 1 : 1. Die Präparate wurden in lichtundurchlässigen Boxen bei 4°C exponiert. Nach dem Entwickeln in Amidol® und der Zwischenwässerung wurde mit Natriumthiosulfat fixiert. Anschließend wurden die Präparate 2 Stunden gewässert und in Eukit® eingedeckt.

4.10. Proteinbestimmung nach der Biuret - Methode

Biuret Reagens: Zu 100 ml 40 %iger NaOH wurde tropfenweise 1 %ige CuSO₄-Lösung gegeben, bis die Lösung eine tiefblaue Farbe annahm.

Durchführung: Auf die zu untersuchende Probe wurde 1 ml Trichloressigsäure gegeben, 10 Min. gewartet und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert. Zum Aufsaugen der restlichen Feuchtigkeit wurde die Probe mit Filterpapier abgedeckt und vorsichtig umgedreht. Nach 30 Min. wurde die Probe abermals gewendet und eventuell am Filterpapier haftendes Eiweiß quantitativ in das Glas gebracht.

Zum getrockneten Eiweiß wurde 1 ml 40 %ige NaOH gegeben und der Ansatz ins Wasserbad gestellt, bis sich das Protein gelöst hatte. Nach Zufügen von 4 ml Biuret-Reagens wurde 30 Min. gewartet und die Extinktion gegen einen Blindwert bei 540 nm gemessen. Der Eiweißgehalt wurde aus einer Eichgeraden ermittelt.

4.11. Die Verteilung von Cinnamoyl-Ruthenocen in Zellorganellen

Prinzip: Ein Zellhomogenat wird mit einer isotonischen Lösung als Medium hergestellt. Die Strukturelemente der Zelle werden durch Differential-Zentrifugation abgetrennt (158).

Homogenat: Die Gewebeprobe wurde in 5 ml 0,25 m Saccharose-Lösung überführt und homogenisiert.

Morphologische Zellfraktionen:

- a) Zellkerne: 5 ml 0,34 m Saccharose-Lösung wurden mit dem Gewebehomogenat überschichtet und 10 Min. bei 800 g entsprechend 3000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert; das Sediment, bestehend aus Zellkernen und Zellwandmaterial, wurde 2 mal mit 0,25m Saccharose-Lösung gewaschen. Diese Fraktion wurde als Kernfraktion bezeichnet.
- b) Mitochondrien: Der Überstand der ersten Fraktion wurde 10 Min. bei 1500 g entsprechend 12000 U/Min. zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde abpipettiert. Das Sediment wurde 2 mal mit je 5 ml einer 0,25m Saccharose-Lösung gewaschen und stellte die Mitochondrien Fraktion dar.
- c) Mikrosomen: Der Überstand der zweiten Zentrifugation wurde 60 Min. bei 105.000 g entsprechend 41.000 U/Min. zentrifugiert. Der neue Überstand wurde abpipettiert. Das Sediment wurde 2 mal mit je 5 ml einer 0,25 m

Saccharose-Lösung gewaschen und als Mikrosomen-Fraktion bezeichnet.

- d) Cytoplasma: Der nach Abtrennung der Mikrosomen verbliebene Überstand stellte die Cytoplasma-Fraktion des Gewebes dar.

4.12.

Tab. 20: Maximale Löslichkeit einiger Ferrocene in
=====

PO₄-Puffer
=====

Von den zu untersuchenden Ferrocenen wurde eine gesättigte Lösung in PO₄-Puffer (20°C) durch 2-minütiges Schütteln und anschließendem Abzentrifugieren der nicht gelösten Substanz hergestellt.

Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und mit Lösungen bekannter Konzentration in Beziehung gesetzt.

	Maxim. Löslichkeit in PO ₄ -Puffer		Ext. Maximum	
	mg/l	mMol/l	ε	nm
Fc-carbonsäure	3430	14,9	4695	259
Fc-carboxamid	1522	6,6	5985	263
Acetyl-Fc	1026	4,5	7752	267
Diacetyl-Fc	1930	7,1	16484	261
Fc-ester	169	0,69	8628	262
Fc-diester	130	0,43	14229	252
Cinnamoyl-Fc	1,9	0,005	63688	307

4 1 1

Tab. 21: Anzahl der Ascites Tumorzellen f (% Zellen)

Ehrlich Ascites Tumorzellen wurden durch regelmäßige Transplantation auf weiblichen CF₁ Mäusen gehalten. Die Zellen wurden 7 Tage nach der Transplantation gewonnen und anschließend nach 2-maligem Waschen in PO₄-Puffer jeweils gewogen und in 4 ml des gleichen Puffers aufgenommen (s. Tab. 5).

Daraus ließ sich der Prozentsatz (mg/ml) Zellen ermitteln. Die Zellen wurden in einer Bauer-Zählkammer gezählt.

g Zellen	Anzahl der Ascites Tumor Zellen pro mg
1,5	3,2 • 10 ⁶
5,2	2,5 • 10 ⁶
7,9	2,1 • 10 ⁶
12,5	3,9 • 10 ⁵
12,9	2,3 • 10 ⁵
16,8	2,2 • 10 ⁵

4.14. Bestimmung der in vitro Resorption von Metallo- cenen in Ehrlich Ascites Tumorzellen.

Ehrlich Ascites Tumorzellen wurden durch regelmäßige Transplantation auf weiblichen CF₁Mäusen gehalten. Die Zellen wurden 6 bis 9 Tage nach der Transplantation gewonnen, und anschließend nach zweimaligem Waschen in Ca^{2+} freiem PO_4^- Puffer (0,025 m, pH 7,4) in dem gleichen Puffer aufgenommen.

Durchschnittlich handelte es sich um eine 10%ige Suspension (g/g). Die Anzahl der Zellen pro mg war von 2 bis 17% Suspension konstant (E. 4.13.), so daß jeweils auf ein genaues Einstellen des Zellgehaltes verzichtet wurde.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Sie wurde nach 20 Min. durch Einstellen der Gläser in Eiswasser beendet. Der pH wurde mit 0,1 n NaOH, bzw. 0,1 n HCl eingestellt. Nach der Inkubation wurde er nochmals überprüft. Angegeben wurde der Mittelwert der beiden Messungen. Der Inhalt jedes Reagenzglases (4,5 ml) wurde auf je 3 tarierte Reagiergefäße verteilt und 2 Min. bei 4000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in tarierte Reagenzgläser dekantiert und die Reagiergefäße mit einem Kleenex-Tuch weitgehend vom Überstand befreit. Anschließend wurden Reagenzgläser und Reagiergefäße gewogen und die Aktivität im Gammazint ermittelt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) T.J. Kealy, P.L. Pauson - Nature (London) 168,
1039 (1951)
- 2) D. Langheim - Inauguraldissertation im
FB 22 der FU Berlin (1974)
- 3) E. Nipper - unveröffentlichte Inaugural-
dissertation im FB 22 der
FU Berlin
- 4) N.E. Herrera, R. Gonzales, - J.Nucl.Med. 6, 792-404 (1965)
R.D. Schwartz
- 5) J.F. Toole, R.Witcofski - J.A.M.A., 198, 197-198, (1966)
- 6) A.L.F.Eddleston, M.O.Rake, - Gut 12, 245-249 (1971)
A.P. Pagaltossos
- 7) M.I.R.D. Committee - J.Nucl.Med. 14, 49-50 (1973)
- 8) F.C. Vándor, A.Szekulesz - J.Nucl.Med. 11, 45-50 (1972)
I.Szabó
- 9) D. Emrich, A.v. Zur Mühlen, - Nucl.Med.(Stuttgart)
H. Bartholomé, A. Favino, 5, 460 (1967)
H.U. Pixberg
- 10) D.B. Sodee in - Radioactive Isotopes in the
Localisation of Tumors
New York, Grune and Stratton
(1969)
- 11) W.H. Bland in - Nuclear Medicine 2nd Ed.,
Mc. Grawhill, New York (1971)
- 12) D. Emrich - Verh.dtsch.Ges.inn.Med.,
70, 870, (1964)

- 13) U. Feine, K.zum Winkel in - Nuklearmedizin, szintigraphische Diagnostik, Thieme Verlag, Stuttgart (1969)
- 14) H.N. Wagner in - Principles of Nuclear Medicine, Saunders, Philadelphia, (1968)
- 15) W.W. Hunter, H.W. De Kock - J.Nucl.Med. 10, 343 (1969)
- 16) D.A. Goodwin, R. Goode, - Radiology 100, 175-179 (1971)
L. Brown
- 17) P.A. Farrer, G.B. Saha, - J.Nucl.Med. 13, 429 (1972)
H.R. Shibata
- 18) P.A. Farrer, G.B. Saha, - J.Nucl.Med. 15, 490 (1974)
D.B. Munro
- 19) E.B. Silberstein, A.J. Tofé- Radiologie, 107, 551-555
E.L. Saenger (1973)
- 20) M.L. Schwartz, C.H. Tator - J.Nucl.Med. 13, 321-327 (1972)
- 21) T.P. Haxnie, T. Konikowski- J.Nucl.Med. 13, 205-210
H.J. Glenn (1972)
- 22) " - J.Nucl.Med. 13, 834-842 (1972)
- 23) S. Silver in - Medicine and Biology,
3rd Ed., in Lea & Febiger,
Philadelphia (1968)
- 24) D.V.A. Low-Beer, H.G. Bell- Radiology 47, 492-493 (1946)
H.J. McCorkle
- 25) W.S. Hagler, W.H. Jarret, - Arch.Ophtalmol. 83, 548-557
W.T. Humphrey (1970)
- 25) W.S. Hagler, W.H. Jarret, - Arch.Ophtalmol. 83, 548-557
W.T. Humphrey (1970)

- 26) H.Pfeiff, H. Strack, - Strahlentherapie 145, 6,
L. Rausch, G. Linhart 702-719, (1973)
- 27) M. Wenzel, R. Otto, - Intern.J.Appl.Rad. and
I. Riehle Isotop. 22, 361-369 (1971)
- 28) R.R. Cavalieri, M.Steinberg- J.Surg.Oncol. 3, 617-624
(1971)
- 29) R.R. Cavalieri, K.G. Scott,- J.Nucl.Med. 7, 197 (1966)
E. Sairenji
- 30) R. Otto, I. Riehle, - Nukl.Med.(Stuttgart)
P. Wöölgens,E. Bieler Suppl. 8, 671 (1970)
- 31) C.Pappavasiliou, - J.Nucl.Med. 12, 265-268
P. Kostamis, P. Angelakis (1971)
- 32) T.K. Chaudhuri, Y.Suzuki, - Radiology, 105, 617-618
R.T. Go (1972)
- 33) N.D. Charkes in - W.H. Blahd, Bone Scanning,
McGrowhill, New York, 470
(1971)
- 34) P.B. Hoffer, K. Lathrop, - J.Nucl.Med. 15, 5, 323-327
C.Bekerman, V.S. Fang, (1974)
S. Refetoff
- 35) N.Back, R.R. Chiels, - J.Nat.Cancer Inst. 36,
G. de Witt, R.H. Branshaw, 171-180 (1966)
C.M. Ambrus
- 36) E. Liss, H. Ernst in - Radionuklide in der klin.&
exp. Onkologie, 361-365,
Schotthauer-Verlag,
Stuttgart (1965)
- 37) I.L. Spar, W.F. Bale - Proc. 9th Congress Internat.
R.L. Goodland, G.di Chiro Soc.Hemat., Moscow, 94 (1962)

- 38) L. Bakay in - Brain Tumor Scanning with
Radioisotopes, Thomas,
Springfield (1969)
- 39) L.M. Freeman, M.D.Blaufox-Seminars Nucl.Med. 1, 1 (1971)
- 40) D.Uthoff, J. Meißner, - Arch.klin.exp.Ophthal. 182,
W.Böke 214-228 (1971)
- 41) K.Hisada, T.Hiraki, - J.Nucl.Med. 7, 41-49 (1966)
S. Ohba
- 42) H.I. Peterson, - Europ. J.Cancer 9,
K.L. Appelgren 543-547, (1973)
- 43) D.M. Goldenberg, - Cancer Research 34, 1-9
D.F. Preston, F.J.Primus (1974)
H.J. Hansen
- 44) R.Bases, S. Brodie, - Cancer Research, 11, 259
S. Rubenfeld (1958)
- 45) J.T. van der Werff - Acta Radiol.Suppl. 243,
 (1965)
- 46) N.D. Charkes, - J. Nucl.Med., 6, 300-306
D.M. Skarloff (1965)
J. Gershon-Cohn
- 47) J.R. Mallard, J.F. Fowler-Br.J.Radiol. 34, 562-568
M. Sulton (1961)
- 48) H. Orii - Strahlentherapie 144, 2,
 192-200 (1972)
- 49) T. Konikowski, - J.Nucl.Med. 14, 3, 164-171
H.J. Glenn, T.P. Haynie (1973)
- 50) L.J. Anghileri - Strahlentherapie 146, 3,
 359-366 (1973)
- 51) R.L. Hayes, B. Nelson - Strahlentherapie 142, 456-
D.C. Swartzendruber 462 (1971)

- 52) R.A. Gams, J. Webb, - Cancer Research, 35,
J.D. Glickson 1422-1426, (1975)
- 53) K. Deckner, G. Becker - Z. Krebsforsch. 76,
U. Langowski, H.Schering, 293-298 (1971)
G. Hornung, C.G. Schmidt
- 54) T. Higashi, M. Kanno, - J.Nucl.Med. 15, 12,
K. Tomura 1167-1170 (1974)
- 55) K. Deckner, G. Becker, - Cancer Research, 34,
U. Langowski, H.Schering, 2957-2960 (1974)
G. Hornung, C.G. Schmidt
- 56) J.D. Glickson, R.B. Ryel, - Cancer Research, 33,
M.M. Bordenca, H.A. Kyoung, 2706-2713 (1973)
R.A. Gams
- 57) D.H. Brown, D.C. Swartzen- - Cancer Research, 33,
druber, J.E. Carlton, 2063 - 2067 (1973)
B.L. Byrd, R.L. Hayes
- 58) C.L. Edwards, R.L. Hayes - J. Nucl. Med. 10,
103-105 (1969)
- 59) R.L. Hayes, B. Nelson, - J.Nucl.Med. 12,
D.C. Swartzendruber 364, (1971)
- 60) " - Science, 167, 289-290
(1970)
- 61) R.L. Hayes, B. Nelson, - J.National Cancer Inst.
D.C. Swartzendruber 46, 941-952 (1971)
- 62) " - J. Cellbiol. 47, 2072-
2082 (1970)
- 63) R.L. Hayes, B.L. Byrd, - J.Nucl.Med. 11, 324,
J.E. Carlton (1970)

- 64) D.A. Goodwin, C.J.Imbornone - J.Nucl.Med. 12, 434,
C.H. Song (1971)
- 65) F. Lomas, P. Dibos, - Nat.Eng.J.Med. 28,
H. Wagner 1323-1329 (1972)
- 66) C.L. Edwards, R.L. Hayes - J.A.M.A. 212, 1182-
1190 (1970)
- 67) R.E. Hartman, R.L. Hayes - J.Pharmacol.Exp.Ther.
168, 193-198 (1969)
- 68) J.D. Perkinson, - Radiol. 61, 543-545,
J.S. Eldridge, D.M.Cooper (1953)
- 69) H. Langhammer, S.F. Grebe - J.Nucl.Med. 13, 25-30,
G. Glaubitt (1972)
- 70) P.A. Farrer, G.B. Saha - J.Nucl.Med. 14, 625-
626 (1973)
- 71) C.Raynaud, R. Isaac, - J.Franc.Med.Chir.Thorac.
M.Rymar 21, 735 (1967)
- 72) L. Rosenthal, N.D.Greyson - Canc.Assoc.Radiol. 21,
S.L. Eidinger 181-183, (1970)
- 73) G.B. Saha, P.A. Farrer in - Radiopharmaceuticals,
G. Subramanian,
B.A. Rhodes, J.F.Cooper,
V.J. Sodd, The Society of
Nuclear Medicine, New York
- 74) T.Higashi, M. Kanno, - J.Nucl.Med. 13, 624,
H. Kurihara (1972)
- 75) A.N. Serafini, W. Dunning - J. Nucl.Med. 12, 464,
K. Charyulu (1971)

- 76) D.M. Taylor in - Radioactive Isotopes in the
Localisation of Tumors,
V.R. McCready, N.G. Trot,
Grune and Stratton,
New York, 73-79, (1969)
- 77) D.Langheim, M.Wenzel, - Chem.Berichte, 108, 146-154
E. Nipper (1975)
- 78) J.E. Furchner, - Health Physics, Pergamon Press,
C.R. Richmond, G.A.Drake Vol.21, 355-365, (1971)
- 79) W.A. Kornicker, B.L.Vallee- Ann.New York Acad.Science,
153, 689, (1968)
- 80) P. Bergmann, C.Lorenz - Z.Chem. 12, 138, (1972)
- 81) P. Bergmann - Acta biol.med.germ., 30,
441, (1973)
- 82) J.L. Madinaveitia - Brit.J.Pharmacol., 24, 352
(1965)
- 83) R.A. Yerry - Toxicology and applied
Pharmacology, 15, 666, (1969)
- 84) A.F. Dratz, J.C. Coberly, - J.Nucl.Med., 5, 40-47 (1964)
J.H. Goldstein
- 85) L. Goldberg, L.E. Martin - Live Science, 3, 1465, (1964)
- 86) C.A. Finch, J.G. Gibbson, - Blood, 4, 905, (1949)
W.C.Peacock, R.G. Fluharty
- 87) R. Dubach, C.V. Moore, - J. Lab. and Clin.Med., 45,
S. Callender 599 (1955)
- 88) C.A. Finch, M Hested, - Blood, 5, 983, (1950)
T.D. Kinney, E.D. Thomas,
C.E. Rath, D. Haskins,
S.Finch, R.G.Fluharty

- 89) M. Wenzel, E. Nipper, - eingereicht im J.Nucl.Med.
W. Klose (1976)
- 90) O. Warburg - The Metabolism of Tumors,
Constable & Co. Ltd. London (1930)
- 91) M. v. Ardenne, B.G. Reit- - Acta biol.med.germ., 22,
nauer, D. Schmidt 35, (1969) Nr. 59
- 92) N. v. Ardenne, - Naturforschung, 25b, 1010.
B.G. Reitnauer, K. Rohde, (1970), Nr. 78
H. Westmeyer
- 93) A. Korolkovas - Grundlagen d. molekularen
Pharmakol., Georg Thieme
Verlag, Stuttgart (1974)
- 94) R.A. Benkeser, D.Goggin, - J.Am.Chem.Soc. 76, 4025
G. Schroll (1954)
- 95) C.S. Dietrich, J.N. Ahaya - J.Biol.Chem. 238, 4,
1544-1548, (1963)
- 96) D. Metcalf - The Thymus, Fortschritte der
Krebsforschung, Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York
(1966)
- 97) G.J.V. Nossal - Antikörper und Immunität,
Suhrkamp Verlag, 1. Aufl.(1972)
- 98) J.F.A.P. Miller - Immunological Function of the
Thymus, Lancet,
2, 748 (1961)
- 99) J.F.A.P. Miller - Effect of neonatal thymectomy
on the immunological responsiveness
of the mouse, Proc.Roy.Soc. (B),
156, 415, (1962)

- 100) J.F.A.P. Miller - Role of the Thymus in Trans-
plantation Immunity, Ann.,
New York, Acad. Sci., 99,
340, (1962)
- 101) Psychrembel - Klinisches Wörterbuch,
Walter de Gruyter & Co.,
.251. Aufl. (1972)
- 102) E.J. Foley - Cancer Research, 13, 835,
(1953)
- 103) L. Gross - Cancer Research, 3, 326
(1943)
- 104) R.T. Prehn, J.M. Main - J.Nat.Cancer Inst., 18,
769 (1957)
- 105) M.M. Black, S.R. Opler, - Surg.Gynec.Obstet, 102,
F.D. Speer 599 (1956)
- 106) W.L. McCarthy, A.E.Mahle - J.Lab.Clin.Med., 6, 473
(1921)
- 107) R.F. Martin, J.B.Beckwith- J.Ped.Surg., 3, 161, (1968)
- 108) T.C.Everson, W.H. Cole in- Spontaneous Regression of
Cancer, Saunders, Philadelphia
(1966)
- 109) H.E.Stephenson, J.E.Delmez-Surg.Gynec.Obstet. 133,
D.I.Renden, R.S.Kipton, 649, (1971)
P.C.Todd, T.L.Charron,
D.A.B. Lindberg
- 110) R.A.Gatte, R.A. Good - Cancer (Philadelphia), 28,
89 (1971)
- 111) H.E. Reis - Dtsch.med.Wochenschr. 96.
170, (1971)

- 112) C.F.Zukoski, D.Killen, - Transplantation, 9, 71, (1970)
E. Ginn, B.Mattern, D.O.
Lucas, H.F. Seigler
- 113) K.E. Hellström, in - Current Concepts in the
I. Hellström Management of Leukemia and
Lamphoma, J.E. Ultmann, M.L.
Greem, W.H. Kirsten, R.W.
Wissler, Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York
(1971)
- 114) J.G. Sinkocics, D.A. - Tex.Rep.Biol.Med. 29,
Dreyer, E. Shirato, J.R. 2, (1971)
Cabiness, C. Shullenberger
- 115) J.G. Sinkocics, E.Shirato- Brit.Med.J. 3, 172, (1970)
J.R. Cabiness,
C.C. Shullenberger
- 116) J.Berczi, P. Strauss- - Science, 180, 1289-1291,
bauch, A.H. Sehon (1973)
- 117) J.A.Batchelor - Cancer Research, 28, 1410 (1968)
- 118) N. Kaliss - Fed.Proc.24, 1024, (1965)
- 119) J.Hellström, - Int.J.Cancer, 4, 587, (1969)
K.E.Hellström
- 120) " - Adv.' Cancer Res. 12, 167 (1969)
- 121) T.H. Shephard - Int.J.Cancer, 6, 346, (1970)
- 122) L.Schwarzenberg, G.Méthé, - Lancet, 365, (1966/II)
J.L.Amiel, A.Cattan, M.
Schneider, J.Schlumberger

- 123) W.T.Newton, R.Donaldson - Amer.J.Surg. 118, 988, (1969)
- 124) P.Trouillas, C.L. Lapras - Neuro-Chirurgie, 16, 143, (1970)
- 125) S.H. Nadler, G.E. Moore - Arch.Surg. 99, 276, (1969)
- 126) E.T. Krementz, M.Samuels,- Surg. Gynec.Obstet. 133, 209,
J.H. Wallace, E.N. Benes
- 127) G. Mathé - Brit.med.J.487, (1970/4)
- 128) D.J. Fialkow, E.D.Thomas,- Lancet, 251 (1971/I)
J.I.Bryant, P.E. Neiman
- 129) E.D. Thomas, J.I. Bryant - Lancet, 1310, (1972/I)
C.D. Bruckner, R.A. Clift,
A.Fefer, F.L. Johnson,
P. Neuman, R.E. Ramberg,
R. Storb
- 130) A.R. Moore, L.Humphrey, - Surg.Gynec.Obstet. 126, 1251
B. Eisemann (1968)
- 131) B.Serrou, C.L.Solassol, - Nouv. Presse med. 1, 197,
H.Pujol, C.Romieu (1972)
- 132) L.J. Humphrey, W.R. Jewell-Ann.Surg., 173, 47, (1971)
D.R. Murray, W.D. Griffen
- 133) S.H. Nadler, G.E. Moore - Arch. Surg., 99, 376, (1969)
- 134) E.P. Cronkite, C. Jansen, - Ann.New York, Acad. Science,
H. Cottier, K.R. Rai, 113, 566, (1964)
C.R. Sipe
- 135) E.D. Field, H.B. Sharpe, - Blood, 39 39, (1972)
K.B. Dawson, V. Andersen,
S.A. Killmann, E. Weeke
- 136) W.L. Ford, J.L. Gowans - Semin. Hematol. 6, 67, (1969)

- 137) J.L. Gowans, E.J. Knight - Progr. Allergy, 9, 1 (1965)
- 138) F. Brahim, P.G. Osmond - Anat.Rec., 168, 139 (1970)
- 139) A.D. Chanana, E.P. Cronkite, D.D. Joel, R.M. Williams, R.M. Waksman - Morphological and functional Aspects of Immunity, C.K. Lindahl-Kiessling, G. Alm, M.G. Hanna jr., 113, Plenum Press, New York, London (1971)
- 140) C.Röpke, N.B. Everett - Cell Tissue Kinetics, 6, 499, (1973)
- 141) C. Ruchti, H. Cottier, E.P. Cronkite, C.R. Jansen, K.R. Rai - Cell Tissue Kinetics, 3, 301 (1970)
- 142) D.D. Joel, M. Wittness, H. Cottier - J.exp.Med.135, 907 (1972)
- 143) A.D. Chanana, M.W. Hess, J.Schaedeli, H. Cottier - J.Immunol., 110, 283, (1973)
- 144) P.G. Scheurlen, K. Lennartz in - Die Milz, K. Lennart, D. Harms, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (19707)
- 145) J. Winkelman, C.J. Collica- Am. J. Roentgenol. Radium S.G. Sandler Ther.Nucl. Med. 103, 881-885, (19707)
- 146) M. Deysine, R.G. Robinson- Surg.Gynec.Obstet. 131, J.R. Wilder 216-220, (1970)
- 147) W.C. Harvey - J.Nucl.Med. 15, 375, (1974)
- 148) A. English, B.R. Andersen - J.Nucl.Med. 16, 1, 5-10 (1975)

- 149) K.G. Hofer, R.L. Waters, - Europ. J.Cancer, Vol. 10,
T.H. Rolfes, M. Hofer 49-56 (1974)
- 150) K.G. Hofer, W. Prensky, - J.Cell Biol. 39, 62 (1968)
W.L. Huges
- 151) K.G. Hofer, S. Rosenoff, - Nature (London) 221,
W. Prensky 576-577, (1961)
- 152) G. Kuschinsky, - Pharmakologie, Gerg Thieme
H. Lüllmann Verlag, Stuttgart, 5. Aufl.
1972
- 153) S. Rapoport - Medizinische Biochemie,
VEB Verlag, Volk und
Gesundheit, 5. Aufl. 1975
- 154) W. Forth, - Pharmakologie und Toxikologie,
D. Henschler, Wissenschaftsverlag,
W. Rummel 1. Aufl. 1975
- 155) E. Mutschler - Arzneimittelwirkungen, Verlags-
gesellschaft mbH., Stuttgart,
1. Nachdruck der 1. Aufl. 1970
- 156) M. Wenzel - Naturwissenschaften,63,
N.Subramanian, E.Nipper 341 (1976)
- 157) H. Meinhold, P.Reichold - Radiochemica Acta, 11, 175,
(1969)
- 158) G.H. Hogeboom in - Methods in Enzymology, Vol.I,
Academic Press. 16-18 (1955)
- 159) H. Tesseraux - in Physiologie und Pathologie
des Thymus. J.A. Barth,1953,
Leipzig

LEBENS LAUF

Geburtsdatum: 7.6.1949

Geburtsort: Wolfsburg

Eltern: Apotheker Heinz Klose und Ehefrau
Herta, geb. Laufer

Schulbildung: 1955 - 1959 Volksschule in Fallers-
leben, Kreis Gifhorn
1959 - 1961 Ratsgymnasium Wolfsburg
1961 - 1968 Theodor-Heuss-Gymnasium
Wolfsburg

Reifeprüfung: 12.6.1968

Praktikum: 1.8.1968 bis 31.7.1970 in der
Widukind-Apotheke, Wolfsburg

Vorprüfung: 22.7.1970

Studium: Wintersemester 1970
Sommersemester 1971, TU Berlin
Wintersemester 1971 bis
Sommersemester 1973, FU Berlin

Staatsexamen: 31. Oktober 1973

Approbation: 12 November 1973

Akademische Lehrer waren die Professoren: Asmus, Eicke,
Fenner, Frömming, Hänsel,
Kreutzberger, Langhammer,
Melchior, Möhrle, Rehse, Riedel,
Rimpler, Schmidt, Wenzel

